Die Synthese von Nucleosiden mit Metaphosphorsäureäthyl-Ester

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Günter Lünzmann

aus Karlsruhe

1965

1966

8459

Die Synthese von Nucleosiden mit Metaphosphorsäureäthyl-Ester

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Günter Lünzmann

aus Karlsruhe

1966

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Dezember 1965

Dekan: Prof. Dr. Dr. G. Weitzel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Schramm

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Auterhoff

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. hc. Gerhard Schramm in der Zeit von Juni 1961 bis Juli 1964 am Max-Planck-Institut für Virusforschung durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. G. Schramm, danke ich recht herzlich für die ideellen Anregungen und die großzügige Förderung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Meiner lieben Frau Inge

in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	5
II.	Theoretischer Teil	11
	1. Struktur, Darstellung und Reaktionsweise des Metaphosphorsäureäthyl-Esters	11
	2. Kinetik der Adenosinbildung	16
	a) Nachweis und Bestimmung der Reaktionsprodukte	16
	b) Standarddarstellung	21
	c) Veränderung der Reaktionstemperatur und des Verhältnisses Adenin/Ribose	24
	d) pH-Abhängigkeit der Reaktion	25
	e) Untersuchungen über den Zerfall des Adenosins	29
	f) Tropfenweise Zugabe der D-Ribose	31
	g) Aktivierung des Adenins	32
	h) Doppelaktivierung des Adenins und der D-Ribose	35
	i) Diskussion	38
	3. Synthese von α- und ß-Desoxyadenosin	41
	a) Charakterisierung der Reaktionsprodukte	41
	b) Einfach- und Doppel-Aktivierung	45
	c) Temperaturabhängigkeit	48
	d) Diskussion	50
	4. Darstellung anderer Adeninglykoside	52
	a) Synthese eines Adeninglucosids	52
	b) Synthese eines Adeninfructosids	55
	c) Synthese eines Adeninglucosylamids	59
	5. Darstellung anderer Riboside	61
	a) Synthese von 8-Azaguanosin	61
	b) Synthese eines Evipan-Ribosids	62
	c) Synthese von Uridin	66
	6. Versuche mit künstlichen Pyrimidinbasen	67
	a) Versuche mit 5-Bromuracil	67
	b) Versuche mit Trifluorothymin	67

Seite

III. Experimenteller Teil 69

1. Darstellung des Metaphosphorsäureäthyl-Esters 69
2. Herkunft von Basen und Zuckern 70
3. Darstellung von Adenosin 70
   a) Standarddarstellung 70
      α) Aufarbeitung durch Fällung mit Äther-Chloroform 71
      ß) Herstellung der Ionenaustauscher-Säulen 71
      γ) Aufarbeitung über Dowex-1-Formiat-Säulen 73
   b) Reinigung 74
   c) Kristallisation 74
   d) Säurehydrolyse 74
   e) Durchführung der kinetischen Untersuchungen 75
   f) Ausbeutenbestimmung 75
   g) Veränderung der Reaktionstemperatur und des Mengenverhältnisses Adenin/Ribose 76
   h) pH-Abhängigkeit der Reaktion 76
   i) Untersuchungen über die Aufspaltung von Adenosin 77
   k) Tropfenweise Zugabe der Ribose 78
   l) Aktivierung des Adenins 78
   m) Doppelaktivierung des Adenins und der Ribose 79
4. Darstellung von 2'-Desoxyadenosin 79
   a) Einfache Aktivierung 79
   b) Doppel-Aktivierung 80
      α) Aufarbeitung 80
   c) Kristallisation 81
   d) Synthese bei 37° C 82
5. Darstellung von Adeninglucosid 82
6. Darstellung von Adeninfructosid 83
   a) Zutropfen der Fructose 83
   b) Doppelaktivierung bei 50° C 83
   c) Doppelaktivierung bei 60° C 84
   d) IR-Spektroskopie 84
7. Darstellung von 2'-Desoxy-2'-amino-glucosyl-adenin 84

Seite

8. Darstellung von 8-Azaguanosin 85
   a) Standardverfahren 85
   b) Zutropfen der Ribose bei 60° C 85
   c) Doppelaktivierung bei 50° C 85
9. Darstellung eines Evipan-Ribosids 85
10. Darstellung von Uridin 86
11. Aktivierung von 5-Bromuracil 87
12. Versuche mit Trifluorothymin 87

IV. Zusammenfassung 88

V. Literaturverzeichnis 91

I. Einleitung

Die Nucleoside sowie deren Phosphatester, die Nucleotide, sind in der Natur weit verbreitet. Sie stellen die Bausteine der hochmolekularen Nucleinsäuren dar, die für die gesamten biochemischen Vorgänge in der Zelle von entscheidender Bedeutung sind. Bekanntlich unterscheidet man nach der Art des vorliegenden Zuckers zwischen Desoxyribonucleinsäuren (DNS) und Ribonucleinsäuren (RNS). Durch verschiedenartige Abbaumethoden lassen sich auf enzymatischem und chemischem Wege Nucleoside gewinnen. - So wurde bereits 1885 aus alkalischen Hydrolysaten von Ribonucleinsäuren Guanosin (1) als erstes Nucleosid isoliert; ebenso wurde kurz danach erstmals Adenosin (2) gewonnen.

Eine bedeutende Rolle spielen in den Zellen die Mononucleotide als Coenzyme. An erster Stelle sei hier das Adenosintriphosphat (ATP) erwähnt, das für die Zelle den wichtigsten Energieüberträger darstellt.

Die pharmakologische Bedeutung von Adenosin und seinen Phosphorsäure-Derivaten (3) ist schon lange bekannt. Sie gehören zusammen mit Histamin und Acetylcholin zu den gewebseigenen, gefäßerweiternden Stoffen. In ihren pharmakologischen Wirkungen sind im allgemeinen zwischen ATP, Adenosinmonophosphat (AMP) und Adenosin keine qualitativen sondern nur quantitative Unterschiede festzustellen. Medizinische Anwendung haben diese Stoffe zur Erweiterung der peripheren Gefäße und zur Erweiterung der Coronargefäße gefunden, da der Coronarkreislauf auch chemisch durch gefäßerweiternde Stoffwechselprodukte reguliert werden

kann. Deshalb verwendet man diese Gruppe auch in gefäßerweiternden Medikamenten zur Behandlung von Angina pectoris und andersartigen Gefäßspasmen.

In erweitertem Sinne versteht man heute unter Nucleosiden N-glycosidische Verbindungen zwischen einer heterocyclischen organischen Base und einem Zucker. In der Natur treten eine Anzahl derartiger Verbindungen als Antibiotika auf. - Erwähnt sei das aus Cordyceps militaris gewonnene Cordycepin (4), das nach dem UV-Absorptionsspektrum ein 9-Glycosid ist, aufgebaut aus Adenin und Cordycepose, einer Desoxyaldopentose. Aus Streptomyces-Arten wurde Psicofuranin (6-Amino-9D-psicofuranosyl-purin) (5) isoliert, das in vivo antibakterielle und cytostatische Aktivität besitzt. Das bekannteste Antibiotikum in dieser Reihe ist das aus Streptomyces alboniger gewonnene Puromycin (6-Dimethylamino-9-(3'amino-3'desoxy-ß-D-ribofuranosyl) purin + p-Methoxyphenylalanin) (6), das sich durch eine große Wirkungsbreite auszeichnet. Bei der Protein-Biosynthese verhindert es den Einbau der an Transfer-RNS gebundenen Aminosäure ins Protein.

Erst in jüngster Zeit fand ein künstliches Nucleosid Eingang in die praktische Medizin. Es gelang, den Herpes corneae, eine Viruserkrankung der Cornea, durch Joduracil-Desoxyribosid (7) zu heilen. Das Virus baut das "falsche" Nucleosid anstelle des natürlichen Thymins in seine Nucleinsäure ein, dadurch wird seine Vermehrungsfähigkeit gestört. Ganz ähnliche Beobachtungen wurden mit 5-Brom-2'-desoxyuridin bei der Vermehrung des Vaccinia-Virus gemacht (8). Allgemein können diese Nucleosidanaloga als Inhibitoren

der Virussynthese angesehen werden. Daneben wurden einige cytotoxische Wirkungen am Herpesvirus beobachtet. Es konnte gezeigt werden, daß 5-Jodo-2'-desoxyuridin (JDU) zwar nicht die Adsorption des Herpesvirus an die Zellen verhindern kann, aber es unterdrückt nahezu vollständig die Replikation (9).

Die Darstellung eines künstlichen Nucleosids mit antileukämischer Wirkung gelang F. Sorm et al. (10) durch Umsetzung der 1-Brom-2'-desoxy-3,4,6-tri-O-acetyl-D-glucose mit dem Chlorquecksilber-II-salz des Adenins in Dimethylformamid und anschließender Methanolyse. Die Synthese ergab 9-(2'-Desoxy-1D-glucosyl)-adenin und 1-(9-Adenyl)-pseudo-D-glukal. Besonders das Anhydro-Derivat wirkt bei Mäusen stark antileukämisch.

Ferner wurde versucht, 6-Mercapto-purin, 8-Azaguanin und andere unphysiologische Basen in natürliche Nucleinsäuren anstelle der entsprechenden richtigen Basen einzubauen. So wurde der Einbau des 8-Azaguanin (11) in die Transfer-RNS von Bacillus cereus durchgeführt. Der Ersatz von Guanin gelang jedoch nur zu etwa 40 %. Da die freien Basen in H_2O schwer löslich sind und besonders in tierische Zellen schlecht eindringen, müßte dagegen mit dem gut löslichen Nucleosid 8-Azaguanosin eine verbesserte Wirkung erzielt werden können. - Neue Möglichkeiten, physiologische und unphysiologische Basen mit Zuckern auf einfachem Wege kondensieren zu können, erschienen daher wünschenswert.

Aufgrund der biochemischen und chemotherapeutischen Bedeutung der Nucleoside befaßten sich viele Arbeitsgruppen mit

deren chemischen Synthesen. Als erstes natürliches Nucleosid wurde 1947 von Todd et al. das Cytidin synthetisiert (12). Zur Synthese mußte zunächst das 2,6-Diäthoxypyrimidin (13) hergestellt werden. Zum anderen wurde die Ribose in das acetylierte C_1'-Halid überführt. Erst dann erfolgte die Kondensation des 2,6-Diäthoxypyrimidins mit der 1-Brom-2,3,5-triacetylribofuranose. Am Schluß der Reaktion mußten die Acylschutzgruppen mit alkoholischem NH_3 wieder entfernt werden. So erhielt man schließlich das gewünschte Cytidin. Entsprechend der großen Zahl von Schritten war die Ausbeute gering.

In ähnlicher Weise verliefen auch die Darstellungen anderer Nucleoside. Im allgemeinen ging man von den Haliden entsprechend geschützter Zucker aus, die mit geschützten Basen zur Kondensation gebracht wurden. Zur Darstellung von Purinnucleosiden setzte man die Silber- oder zweckmäßigerweise Quecksilber-(II)-chloride der Purine mit den C_1'-Haliden der Ribose oder Desoxyribose um. - Unter Verwendung des Chloromercuri-Derivats des Adenins gelang J. Davoll (14) die Synthese von Adenosin. Er erreichte dabei Ausbeuten bis zu 27 %. Jedoch wurde das Verfahren durch die 6 erforderlichen Reaktionsschritte ziemlich erschwert.

Besondere Schwierigkeiten bereitete die Synthese von Desoxynucleosiden, da das C_1'-Halid der 2'-Deoxyribose labil ist. - Nach dem alten Verfahren von Fischer und Helferich das von 1-Chlor-3,5-di(O-acetyl)2'-desoxyribofuranose ausging, erhielt H. Venner (15) weniger als 1 % ß-Desoxyadenosin. - Das beste Verfahren zur Darstellung von Desoxyadenosin unter Verwendung von Schutzgruppen entwickelte

Fletcher (16). Zur Desoxyadenosin-Synthese ging er von 1-Chlor-3,5-di-(p-nitrobenzoyl)2'-desoxyribofuranose aus, die er mit Chloromercuri-6-benzaminopurin in Dimethylsulfoxyd-Lösung umsetzte. Dabei erhielt er 10 % ß-2'-Desoxyadenosin neben 19 % des α-Anomeren.

Wegen der hohen Empfindlichkeit der Desoxyzucker ging man in einigen Laboratorien von den Ribonucleosiden aus, um Desoxyribonucleoside zu gewinnen (17). So gelang es, 2'-Desoxyuridin und Thymidin aus Sulfosäureestern von Ribonucleosiden zu erhalten. Bereits der erste Versuch, geschütztes 2'-O-Tosyluridin mit NaJ umzusetzen, ergab ein kristallines Desoxyjod-Derivat, aus dem durch Entacetylierung und katalytische Reduktion 2'-Desoxyuridin entstand. - Die Reaktionsfähigkeit der 2'-O-Tosyluridin-Derivate ist auf die intermediäre Bildung von Cyclonucleosiden (18) zurückzuführen.

Die Nachteile der bekannten klassischen Synthesen zur Darstellung von Purin- und Pyrimidin-Nucleosiden bzw. Desoxynucleosiden sind einmal die zahlreichen Reaktionsschritte, die sehr viel Zeit erfordern, und zum anderen die meist geringen Ausbeuten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, unter Vermeidung von Schutzgruppen in einem möglichst einfachen Verfahren Nucleoside darzustellen. Hierzu bot sich das von G. Schramm, H. Grötsch und W. Pollmann beschriebene Verfahren an (19), bei dem ein Metaphosphorsäureäthyl-Ester als Reaktionsvermittler verwendet wurde. H. Wissmann (22) hatte erstmals in der synthetischen Chemie diesen Metaphos-

phorsäureäthyl-Ester zur Polymerisation von Tripeptiden zu Polypeptiden benutzt.

Die erwähnte Methode zur Darstellung von Nucleosiden (19) lieferte bisher nur schwankende Ausbeuten, daher sollte der Mechanismus der Reaktion genauer untersucht werden. Diese Versuche wurden bevorzugt am Beispiel der Adenosinsynthese durchgeführt.

Die erste Aufgabe bestand darin, eine zuverlässige Methode zur Bestimmung des Reaktionsproduktes auszuarbeiten. Anschließend sollten bei kinetischen Untersuchungen sämtliche für die Synthese wichtigen Größen wie Zeit, Temperatur und pH-Wert abgewandelt werden. Nach Auffindung der günstigsten Bedingungen sollten dann die Darstellungen des Desoxyadenosins, des Uridins und einer Reihe anderer nicht in der Natur vorkommender Nucleoside versucht werden.

Die Ausdehnung des Verfahrens auf künstliche Nucleoside soll u.a. zur Gewinnung von Antimetaboliten auf einfachem chemischem Wege dienen.

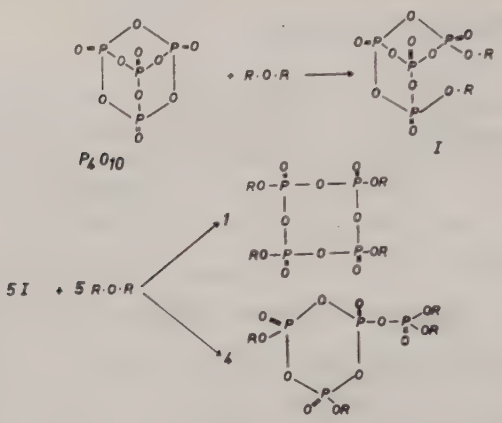
II. Theoretischer Teil

1. Struktur, Darstellung und Reaktionsweise des Metaphosphorsäureäthylesters

Zu Beginn der Arbeit war es erforderlich, die bestehenden Darstellungsmethoden des Metaphosphorsäure-Esters (MPE) nachzuprüfen. Dabei ergab sich, daß die bereits 1910 von Langheld (23) beschriebene und neu von W. Pollmann ausgearbeitete Vorschrift (24) zur Darstellung des Esters variiert und weitgehend präzisiert werden mußte, da von der sorgfältigen Bereitung des Esters das Gelingen der Kondensation abhängig ist.

Nach R. Rätz und E. Thilo (25) handelt es sich bei diesem cyclischen Ester um ein Gemisch von etwa 90 % der Iso-Verbindung (Formel III) und 10 % des entsprechenden Äthyltetrametaphosphorsäure-Esters (Formel II). Der Ester entsteht dadurch, daß in dem tetraedrischen Molekül P_4O_{10} zwei P-O-P-Bindungen (Formel I) durch Ätherolyse gespalten werden. Durch die Einwirkung von 2 Mol Äthyläther auf das tetraedrische P_4O_{10}-Molekül entstehen Produkte der Summenformel $P_4O_8(OR)_4$.

Abb. 1: Ätherolyse von P_4O_{10} $R = C_2H_5$

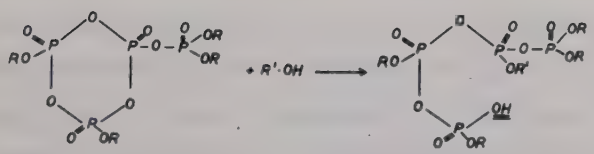


Zur Darstellung ist möglichst reines sublimiertes P_4O_{10} zu verwenden. Dieses analysenreine P_4O_{10} wird mit gut getrocknetem Chloroform und absolutem Äther am Rückfluß gekocht. - Durchgeführte Versuchsreihen ergaben dabei als günstigste Reaktionstemperatur 65° C. Versuche bei 50° C brachten bereits schlechte Ergebnisse, da sich das P_4O_{10} nur teilweise gelöst hatte. - Die günstigste Reaktionszeit liegt bei 20 bis 24 Stdn. In diesem Zeitraum muß sich das Pentoxyd vollständig gelöst haben. Die Reaktionsdauer von 24 Stdn. sollte jedoch nicht überschritten werden, da sonst durch Aufspaltung weiterer P-O-P-Bindungen reaktionsunfähige offenkettige Polyphosphorsäure-Ester entstehen. - Kräftiges Rühren während der Reaktionszeit soll verhindern, daß das P_4O_{10} am Boden des Kolbens überhitzt wird. Sonst könnte eine weitere Ätherolyse zu einem inaktiven Ester eintreten, den man an seiner dunklen Farbe und der geringeren Viskosität erkennt.

Die Kinetik der Hydrolyse des reaktionsfähigen MPE sowie seine Reaktionsweise mit verschiedenen OH- und NH-haltigen Verbindungen wurden von W. Pollmann und G. Schramm (24) untersucht. Im IR-Spektrographen fanden sie ein Absorptionsspektrum, das weitgehend mit dem Spektrum des von F. Cramer (26) dargestellten Triäthylmetaphosphates übereinstimmt. Besonders auffallend ist dabei eine starke Bande bei 1310 cm^{-1}, die nach F. Cramer für cyclische Phosphorsäure-Ester charakteristisch ist. - Läßt man Luftfeuchtigkeit auf die Chloroform-Lösung des Äthylmetaphosphates einwirken, so verschwindet diese charakteristische Bande langsam, dafür erscheint eine neue, für offenkettige Polyphosphorsäure-Ester charakteristische Bande zwischen 1200 - 1250 cm^{-1}. - Bei dem Ester handelt es sich also um ein cyclisches Metaphosphat, das bereits durch 1 Mol einer hydroxylhaltigen Verbindung aufgespalten wird.

Durch potentiometrische Titration in wässriger Lösung können die hierbei auftretenden primären und sekundären Phosphatgruppen verfolgt werden.

Abb. 2: Reaktion des Isometaphosphat-Esters mit OH-haltigen Verbindungen



In wasserfreiem Medium wurden titrimetrisch die Reaktionen mit OH- und NH-haltigen Verbindungen untersucht und dabei die neu auftretenden primären Phosphatgruppen erfaßt. -
Für die geplante Kondensation von Nucleosiden interessiert das Verhalten von zwei Substanzgruppen, nämlich einmal das der Purin- und Pyrimidinbasen und zweitens das der verschiedenen Zucker.
Es konnte gezeigt werden, daß bei Umsetzungen von Purin und Uracil mit dem Ester auf je 1 Mol Substanz etwa 1 Mol primäre Phosphatgruppen entstehen. Wahrscheinlich reagiert beim Uracil nur der Stickstoff in 3-Stellung und beim Purin der Stickstoff in Stellung 9 mit einer P-O-P-Bindung. Beim Adenin dagegen entstehen auf 1 Mol Substanz je 2 Mol primäre Phosphatgruppen. Hier reagiert die C_6-ständige NH_2-Gruppe mit der P-O-P-Bindung, und ein zweiter P-O-P-Rest verbindet sich mit dem Stickstoff in Position 9.
Bei den Zuckern reagieren D-Ribose und D-Glucose mit je 2 Mol MPE. Es konnte z.B. bei der D-Ribose gezeigt werden, daß die reaktionsfähigsten OH-Gruppen einmal das halbacetalische OH am C_1' und zum anderen das primäre OH am C_5' sind. Die D-Ribose hatte nach 1/2 Std. bei 50° C etwa 1 Mol, nach 2,5 Stdn. etwa 1,8 Mol primäre Phosphatgruppen entwickelt. Die Titrationskurve strebt einem Endpunkt von 2 Mol MPE pro Mol Ribose zu.

Der cyclische Ester kann also mit primären und sekundären glykosidischen Hydroxylgruppen und mit primären und sekundären Aminogruppen reagieren. Diese Reaktionsfähigkeit ist insbesondere auf den cyclischen Charakter des Metaphosphorsäure-Esters zurückzuführen. Die aktivierten Gruppen können

je nach Wahl der Versuchsbedingungen verschiedene Folgereaktionen eingehen.

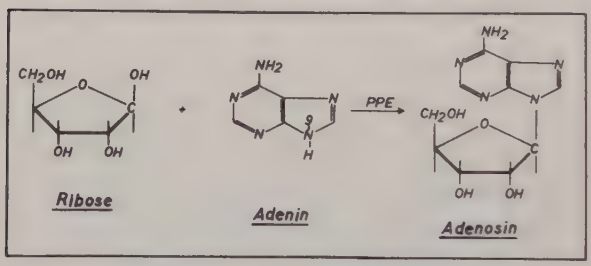
Diese Untersuchungen über die Reaktionsweise des Esters bilden eine wichtige Grundlage für das Verständnis der mit MPE durchzuführenden Nucleosid-Synthesen.

2. Kinetik der Adenosinbildung

Adenosin = N-9-(1'-ß-Ribosyl)-Adenin

Die Kondensation eines Zuckers mit einer heterocyclischen N-Base mit Hilfe von MPE zu einem Nucleosid wurde zunächst am Beispiel des Adenosins durchgeführt, da hier die Eigenschaften der Ausgangsstoffe bekannt waren und das Endprodukt leicht mit natürlichem Adenosin verglichen werden konnte.

Abb. 3: Adenosinsynthese



Um diese Reaktion genau untersuchen zu können, mußten außer dem Adenosin auch die auftretenden Nebenprodukte gut bestimmbar sein.

a) Nachweis und Bestimmung der Reaktionsprodukte

Ribose und ein Überschuß von Adenin wurden, wie unten noch genauer beschrieben wird, in salzsaurem Dimethylformamid

(DMF) mit cyclischem MPE umgesetzt. Zur Charakterisierung und quantitativen Bestimmung der hierbei entstandenen Produkte bot sich als erstes die Papierchromatographie an. Neben dem noch im Überschuß vorhandenen Adenin konnte deutlich das synthetisierte Nucleosid als Adenosin charakterisiert werden. Daneben wurden etwas Adenylsäure sowie in kleinen Mengen Polyribose und zwei UV-absorbierende Kondensationsprodukte festgestellt, deren Strukturen nicht weiter untersucht wurden.

Bei der quantitativen Bestimmung der Adenosin-Ausbeute brachte die Papierchromatographie keine befriedigenden Ergebnisse, deshalb mußte eine andere Trennungsmethode angewandt werden. Zur quantitativen Trennung und Bestimmung erwies sich die Aufarbeitung durch Säulenchromatographie als geeignet.
Es wurde mit Dowex-1 X_{10}-Anionenaustauscher-Säulen, 200 - 400 mesh, in der Formiatform gearbeitet und ein automatischer Fraktionssammler verwendet.

Die Säulentrennung verlief nach dem von W.E. Cohn beschriebenen Verfahren (27,28). Bei der Elution der stark basischen Säulen mit einem Puffer von pH 10,2 wurde zunächst das Syntheseprodukt erhalten, dessen Elutionspunkt mit dem von natürlichem Adenosin zusammenfiel. Die Isolierung des restlichen, nicht umgesetzten Adenins erfolgte danach bei pH 8,25. Bei pH 2,75 schließlich wurde mit dem Elutionspuffer die kleine Menge an Adenylsäure isoliert.

Das nach der Säulentrennung erhaltene Produkt des synthetisierten N-Glykosids wurde anschließend noch gereinigt.
- Die wässrige Lösung des N-Glykosids wurde dazu mit Barytwasser versetzt, um restliches anorganisches Phosphat aus-

zufällen. Dann wurde die Lösung mit Äthanol behandelt, hierbei fiel Äthylphosphat aus. - Diese so gereinigte Lösung wurde in verschiedenen chromatographischen Systemen mit natürlichem Adenosin verglichen.

Tabelle 1

R_f-Werte der Syntheseprodukte im Vergleich mit natürlichem Adenosin

	R_f1	R_f2
Adenosin Calif.Corp.	0,34	0,28
Adenosin synth.	0,34	0,29
Subst. I	0,21	0,25
Subst. II	0,12	0,18

R_f1 = Isopropyläther-Äthanol-H_2O (16 : 4,5 : 1)

Das System lief 36 - 48 Stdn. und wurde auf Adenin als Standard bezogen (Ad = 1)

R_f2 = n-Butanol/H_2O

Lokalisiert wurden die Banden auf den Chromatogrammen durch ihre Absorption im UV-Licht. - In einigen Ansätzen, jedoch nicht immer, traten neben dem natürlichen Adenosin noch zwei wesentlich schwächere Nebenflecken auf. Möglicherweise handelt es sich bei der Substanz I um Spuren des α-Isomeren oder um ein anderes, dem Adenosin sehr ähnliches Derivat, evtl. um ein N_7-Glykosid.

Das synthetisierte Adenosin wurde danach mit chemischen Methoden charakterisiert. So ließ sich die gewonnene Substanz durch Säurehydrolyse mit H_2SO_4 oder HCl nach etwa 2 Stdn. bei 85° C am Rückfluß wieder in Adenin und Ribose spalten. Die Spaltprodukte wurden chromatographisch nachgewiesen.

Die Perjodattitration des synthetisierten Nucleosids nach E.L. Jackson (29) ergab einen Verbrauch von 1 Mol., d.h. die Ribose wurde, wie zu erwarten war, nur einmal gespalten. Eine Phosphorylierung am C_2' und C_3' durch das MPE ist also nicht erfolgt.

Das synthetisierte Adenosin ließ sich nach der Methode von I. Davoll und B.A. Lowy (14) zur Kristallisation bringen. Die kristalline Substanz, das 9-ß-D-Ribofuranosyladenin besaß folgende Eigenschaften:

Tabelle 2

Chemische Eigenschaften des synthetisierten Adenosins

	R_f1	R_f2	R_f3	$(\alpha)_D$	IR	UV bei pH 2 E max (mμ) 250/260	
ß-Adenosin synth.	0,53	0,11	0,29	-60	+	257	0,844
ß-Adenosin Calif.Corp.	0,53	0,11	0,28	-61,5	+	257	0,84

R_f1 = Amylalkohol/5 % sek. Na-Phosphat in wässriger Lösung (1:1)

R_f2 = Amylalkohol/H_2O

R_f3 = n-Butanol/H_2O

Die Tabelle zeigt einmal, daß die R_f-Werte des synthetisierten Nucleosids gut mit denen des natürlichen Adenosins übereinstimmen. - Bei der Messung der spezifischen Drehung wurde annähernd der theoretische Wert erreicht. - Die UV-Absorptionskurve ist identisch mit der des natürlichen Adenosins und zeigt ein Extinktionsmaximum bei 260 mμ. Hier-

durch ist die Möglichkeit einer falschen Kondensation ausgeschlossen, denn nur die synthetisch zugänglichen N_7-Glykoside des Adenins haben ein Absorptionsmaximum bei 270 mμ.

Als letzter Beweis für die Identität des synthetisierten Nucleosids mit Adenosin wurde schließlich das Infrarot-Spektrum im Leitz-Spektrographen in festem KBr aufgenommen. Die beiden Spektren sind identisch. - Wegen der großen Empfindlichkeit der IR-Spektren gegenüber Konstitutionsunterschieden ist die Gleichheit der IR-Spektren neben den angeführten chemischen und physikalischen Ergebnissen der beste Beweis dafür, daß bei der Reaktion von Adenin und D-Ribose mit MPE das natürliche 9-ß-D-Ribofuranosyladenin entsteht.

Neben dem Adenosin trat bei der Elution der Säule auch in geringen Mengen Adenylsäure auf. Da jedoch die Phosphorylierung langsamer verläuft als die N-Glykosidbildung, ist der Verlust durch diese Nebenreaktion bei richtig gewählter MPE-Menge und Reaktionszeit gering. - Eine zweite Konkurrenzreaktion ist die Kondensation mehrerer Ribosemoleküle untereinander. So konnten bei der Papierchromatographie jeweils neben dem synthetisierten Nucleosid eine Reihe von Flecken der Zuckerkomponente nachgewiesen werden, bei denen es sich um Di-, Oligo- und Polyzucker handelte. Die Flecken der chromatographierten Zucker wurden in dem System n-Butanol-Eisessig-H_2O (5 : 1 : 4) durch Besprühen des Chromatogramms mit acetonhaltiger $AgNO_3$-Lösung und 0,5 m-NaOH-Lösung in Methanol nachgewiesen.

Die Bildung von O-Glykosiden spielt erst unter energischen Bedingungen und bei wesentlich höherer Konzentration eine

Rolle (30). Die Verluste an Zucker lassen sich auf ein Minimum herabdrücken, wenn man einen Überschuß an Adenin verwendet. Sie können dann vernachlässigt werden.

Nachdem damit die Nachweismethoden und Konstitutionsermittlungen abgeschlossen waren, konnte die Kinetik der Synthese untersucht werden.

b) Standarddarstellung

Die Reaktion soll nicht länger als nötig ausgedehnt werden, um die Selbstkondensation der Zucker untereinander und auch die Phosphorylierung der gebildeten Nucleoside nicht zu begünstigen. Deshalb war eine Untersuchung über die Zeitabhängigkeit der Nucleosidsynthese notwendig. - Um die Kinetik der Adenosinbildung genau untersuchen zu können, mußten zunächst möglichst einfache und übersichtliche Bedingungen geschaffen werden. Der Nullpunkt sowie alle übrigen bei der Reaktion eine Rolle spielenden Größen waren genau zu definieren.

Die beiden Ausgangsprodukte Adenin und Ribose wurden getrennt in Lösung gebracht. Die 1. Lösung enthielt die heterocyclische Base und MPE in DMF. Etwas konz. HCl (0,5 ml) war erforderlich, um die Base in DMF zu lösen. Die 2. Lösung bestand aus der Zuckerkomponente in DMF. Das Verhältnis von Adenin zu D-Ribose wurde mit 5 : 1 festgelegt. Die MPE-Menge, 3 g auf 1 g Adenin, und eine bestimmte Menge an Lösungsmittel (150 ml) wurden zunächst willkürlich gewählt. - Der Zeitpunkt, bei dem beide Lösungen zusammengegeben und in ein Glycerinbad von 50° C gebracht wurden, wurde als

Start (= Zeit 0) bezeichnet. Von der bei konstanter Temperatur (50° C) reagierenden Lösung wurden jeweils nach bestimmten Zeiten Proben entnommen. Dann wurde das Lösungsmittel an der Wasserstrahlpumpe abdestilliert und der verbleibende Rückstand mit H_2O aufgenommen und neutralisiert. Hierbei fiel ein großer Teil des nicht umgesetzten Adenins aus. Die weitere Aufarbeitung der Proben konnte auf zwei Arten erfolgen: entweder durch eine fraktionierte Kristallisation, da die Löslichkeit der Nucleoside in H_2O bedeutend höher ist als die der freien Basen, oder durch die bereits beschriebene Säulenchromatographie. Das 1. Verfahren ist jedoch sehr umständlich und fand daher in den folgenden Versuchsreihen keine Anwendung. Nach der 2. Methode wurden sämtliche Zeitproben einzeln über Dowex-1-Formiat X_{10}-Säulen aufgearbeitet.

Der bei 50° C durchgeführte Versuch ergab folgende Ausbeuten an Adenosin:

Tabelle 3

Abhängigkeit der Adenosinausbeute von der Reaktionszeit bei 50 - 55° C

Zeit (h)	Ausbeute (%)
20 Min.	10,5
1	13,5
3	20,5
6	14,5
9	8,0

Dieses beschriebene Verfahren wird in der Arbeit als Standarddarstellung bezeichnet. - Bereits nach 3 Stdn. wurde jeweils ein Maximum von 20 % Adenosin erreicht. Die stöchiometrische Ausbeutenberechnung wurde auf die eingesetzte Ribosemenge bezogen. Die Adenosinausbeute sank bei sämtlichen Ansätzen wieder schnell ab und lag nach 9 Stdn. bei nur noch 8 - 10 %.

Um den Verbleib des Adenins zu verfolgen, wurde ein Standardansatz vollständig aufgearbeitet. Dabei wurde folgende Adeninbilanz aufgestellt:

Tabelle 4

Vor der Säulentrennung ausgefallenes Adenin	=	654 mg
Adenin als Nucleosid - aus Säulentrennung bei pH 10,2 (Charakterisiert durch Chromatographie)	=	31 mg
Adenin aus Säulentrennung bei pH 6	=	215 mg
Adenin als Nucleotid - aus Säulentrennung bei pH 2,7 (Charakterisiert durch Chromatographie)	=	9 mg
		909 mg
Verlust an Adenin während der Reaktion	=	91 mg
		1000 mg

Die Ausbeute an Adenosin bei einem Adenin-Ribose-Verhältnis von 5 : 1 betrug 60 mg Adenosin = 19 %.

Tabelle 5

Verhältnis des Ausgangsproduktes Adenin zur Ausbeute an Adenosin und Adenylsäure

Eingesetzte Adeninmenge	Verhältnis Ad./Rib.	MPE-Menge	Ausbeute (%)	
			Adenosin	Adenylsäure
1 g	5 : 1	3 g	19	5

Diese Standarddarstellung wurde im Verlauf der kinetischen Untersuchungen vielfach abgeändert.

c) Veränderung der Reaktionstemperatur und des Verhältnisses Adenin/Ribose

Die Reaktionstemperatur wurde auf 37° C herabgesetzt, während alle übrigen Reaktionsbedingungen unverändert blieben. Bei dieser Temperatur war die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich verlangsamt und das Reaktionsmaximum von 20 % wurde erst nach etwa 25 Stdn. erreicht, gegenüber nach 3 Stdn. bei 50° C.

W. Pollmann hatte bereits die Abhängigkeit der Ausbeute an Adenosin vom Adenin/Ribose-Verhältnis untersucht. Danach kann durch größeren Adeninüberschuß die Ausbeute an Adenosin gesteigert werden. Diese Ergebnisse wurden grundsätzlich bestätigt. - Bei einem Verhältnis Adenin:Ribose 1 : 1 oder 2 : 1 waren die Ausbeuten immer sehr gering. Während die Adenosin-Ausbeute bei einem Verhältnis von 5 : 1 stets bei ca. 20 % lag. Eine Steigerung der Ausbeute auf das Doppelte bei einem Verhältnis von 10 : 1 konnte allerdings

nie erreicht werden. In diesem Falle betrug die maximale Ausbeute an Adenosin 28 %. Das Maximum der Ausbeute wurde allerdings erst nach 27 Stdn. erreicht, wie die Tabelle zeigt.

Tabelle 6

Abhängigkeit der Adenosinausbeute von der Reaktionszeit bei 37° C

Zeit (h)	Ausbeute (%)
10	16,3
21	20,2
24	24,2
27	27,5
30	15,5
33	15,1

d) pH-Abhängigkeit der Reaktion

Es wurde erwartet, daß durch den Verzicht auf HCl bessere Ausbeuten erzielt werden können, da Nucleoside bekanntlich durch höhere Protonenkonzentrationen gespalten werden.

Deshalb wurden abweichend von der Standarddarstellung einige Ansätze ohne konz. HCl durchgeführt, während alle anderen Reaktionsbedingungen unverändert blieben. Die Base allein löste sich nicht in DMF ,und eine klare Lösung trat erst nach Zusatz des Esters langsam ein. - Während die Adenosinausbeute mit HCl nach 3 Stdn. einen Wert von 20,5 % erreichte, waren für die gleiche Ausbeute ohne HCl 12 Stdn. erforderlich.

Tabelle 7

Adenosinausbeute eines Ansatzes
ohne HCl bei 50° C

Zeit (h)	Ausbeute (%)
3	4
6	11,6
9	15,7
12	20,4

Wie der Versuch zeigte, wirken Protonen auf die Reaktion beschleunigend. Der Höchstwert von 20 % konnte zwar erreicht werden, jedoch durch die geringe Protonenkonzentration erst nach starker zeitlicher Verzögerung. Die Säure dient nicht nur zum Lösen der Base, sondern greift auch aktiv als Protonendonator in die Synthese ein.

Dieses Ergebnis bestätigten die Ansätze ohne HCl bei 37° C, die nach 27 Stdn. nur etwa 1/3 der Normalausbeute ergaben.

Tabelle 8

Adenosinausbeute mit und ohne HCl bei 37° C

Zeit (h)	Ausbeute (%) ohne HCl	mit HCl
27	9,8	27,5

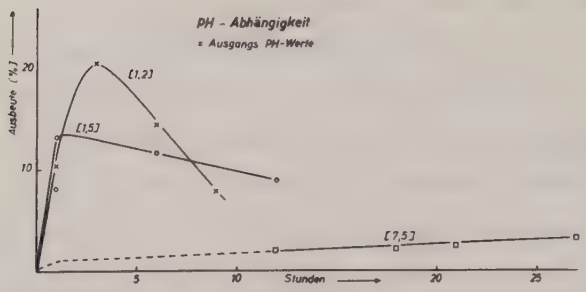
In den bisher beschriebenen Versuchen mit HCl entfielen auf 150 ml DMF 0,5 ml konz. HCl, dem entsprechen etwa 0,3 % H_2O pro Ansatz. Obwohl diese geringe Menge an Wasser auf

die Kondensation noch keinen negativen Einfluß haben dürfte, wurde trotzdem versucht, gasförmiges HCl in die Ansätze einzuleiten. Die sehr wichtige genaue Dosierung der HCl-Gas-Menge bereitete Schwierigkeiten ,und ein Überschuß an HCl-Gas hemmte die Synthese. Bei richtiger Dosierung konnte keine Steigerung der Ausbeute beobachtet werden, deshalb wurde diese Methode bisher auch nicht weiter verfolgt. Bei schwierig zu synthetisierenden Nucleosiden oder geringeren Lösungsmittelmengen sollte sie aber doch versucht werden.

Anschließend wurde der katalytische Einfluß der Protonen auf die Synthese genau untersucht. Die Protonenkonzentration wird als pH (DMF) angegeben, sie ist selbstverständlich nicht mit dem pH einer wässrigen Lösung zu vergleichen. Um eine DMF-Lösung mit einem pH von 9,5 auf einen pH-Wert von 1,5 zu bringen, ist etwa 10mal mehr HCl erforderlich als für eine entsprechende wässrige Lösung.

In den folgenden Versuchen wurden gegenüber der Standarddarstellung nur die pH-Werte der Reaktionslösungen variiert. Durch Zugabe von Tritähylamin wurde die Reaktionslösung auf den gewünschten pH-Wert gepuffert.

Abb. 4: pH-Abhängigkeit der Kondensation



Man ersieht aus Abb. 4, daß die Ausbeute an Adenosin, die mittels Säulenchromatographie bestimmt wurde, bei einem neutralen Ausgangs-pH von 7,5 minimal war. Sie ließ sich auch bei längerer Reaktionsdauer nicht bedeutend steigern. - Der Ansatz mit dem Ausgangs-pH von 1,5 dagegen zeigte einen steilen Anstieg der Ausbeute und erreichte sein Maximum bereits nach 1 Std. Wurde auch nur eine geringere Menge erhalten als bei der zum Vergleich eingezeichneten Kurve eines ungepufferten Ansatzes (Ausgangs-pH 1,2), so sank doch die Ausbeute langsamer ab. - Die höchste Ausbeute wurde bei pH 1,2 erreicht, aber hier ist das zeitlich kurz begrenzte Maximum ungünstig. Es bedeutet schon deshalb einen Vorteil, in gepufferter Lösung zu arbeiten. Jedoch müßte es zuerst gelingen, die Ausbeute wieder auf 20 % zu steigern.

Aus diesen Versuchen über die pH-Abhängigkeit der Reaktion geht klar hervor, daß die Kondensation Protonen benötigt. Allerdings wird nicht nur die Kondensation, sondern auch die rückläufige Reaktion bei hohen Protonenkonzentrationen begünstigt.

e) Untersuchungen über den Zerfall des Adenosins

Zur Untersuchung der rückläufigen Reaktion bei der Adenosin-Synthese wurden einige Modellversuche mit handelsüblichem Adenosin durchgeführt.

Dieses Adenosin wurde mit MPE in saurem DMF auf 50° C gebracht. Beim Start betrug der pH-Wert 1,5. Von dieser Reaktionslösung wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen. - Die quantitative Adeninbestimmung zeigte, daß mit zunehmender Reaktionsdauer das Gleichgewicht immer weiter zugunsten der Spaltung in Adenin und Ribose verschoben wurde.

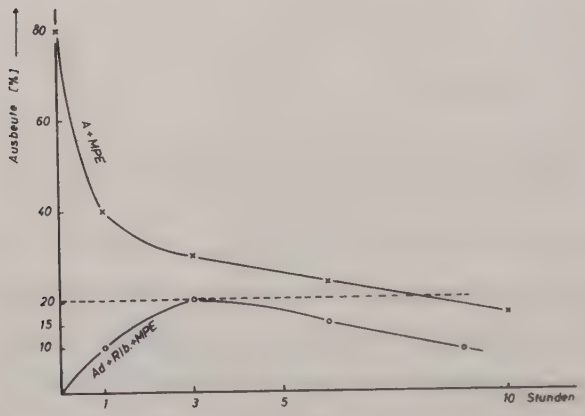
Tabelle 9

Zerfall des Adenosins (in %) bei längerer Reaktionszeit

	Zeit (h)	pH	Ausbeute (%)
Ausgangs-pH 1,5	0	1,5	80
	1	1,5	40
	3	1,58	30
	6	1,78	24,8
	10	1,94	17

Bei der papierchromatographischen Bestimmung der Zeitproben ließen sich neben dem Adenosin stets Adenin und Ribose nachweisen. Daneben entstanden in kleinen Mengen Adenylsäure und Polyribose. Die Phosphorylierung des Adenosins fand also nur als Nebenreaktion statt.

Abb. 5: Vergleich von Synthese und Aufspaltung des Adenosins

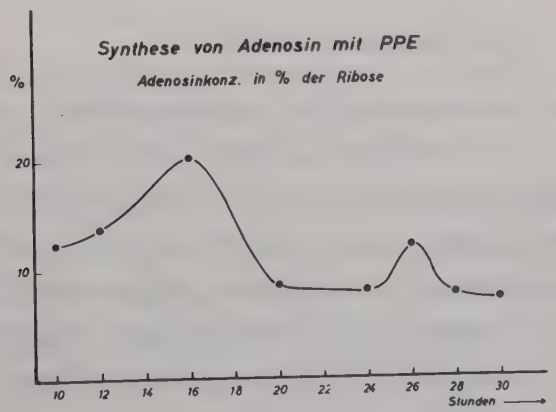


Vergleicht man diese rückläufige Reaktion von Adenosin und MPE graphisch mit der Standarddarstellung von Adenosin, so fällt auf, daß beide Kurven einem Gleichgewicht bei 20 % Adenosin zustreben. Der parabelartige Verlauf der Synthesekurve zeigt, daß zunächst die Synthese überwog und dann langsam der Zerfall überhand nahm. Demnach schien sich kein stabiles Gleichgewicht einzustellen.

f) Tropfenweise Zugabe der D-Ribose

Als nächstes Ziel wurde ein Verfahren gesucht, das bei möglichst stark gedämpfter rückläufiger Reaktion mindestens 20 % Adenosin liefert. Dazu wurde auch die Vorschrift zur Adenosinbildung nach W. Pollmann (20) überprüft. In einem Zeitraum von 4 - 5 Stdn. wurde die Ribose langsam zum Adenin zugetropft, damit dieses stets im Überschuß vorhanden war. Dieses langsame Zutropfen diente als Schutz gegen Selbstkondensation des Zuckers. Als Reaktionsbeginn galt hier der Zeitpunkt, bei dem die salzsaure Adeninlösung mit MPE in ein Glycerinbad von 50° C gebracht und mit dem Eintropfen der Riboselösung in diese Adeninlösung begonnen wurde. Die im Reaktionsansatz vorhandene Menge an Adenosin wurde über einen Zeitraum von 30 Stdn. beobachtet, um die Abhängigkeit der Ausbeuten von der Länge der Reaktionsdauer zu ermitteln. Dabei wurde stets eine einer Kippschwingung ähnliche Kurve gefunden, deren 1. Maximum zwischen 16 und 18 Stdn. und deren Minimum jeweils bei 24 Stdn. lag. Die Kurve zeigte außerdem ein zweites, schwächeres Ansteigen bei 26 - 28 Stdn.

Abb. 6:



Eine solche Oszillation um eine bestimmte Gleichgewichtslage in homogener Lösung ist bei chemischen Reaktionen sehr ungewöhnlich. Es wurde nach Erklärungen für diese höchst merkwürdige Erscheinung gesucht. Es konnte einmal durch potentiometrische Titrationen festgestellt werden, daß auch die Protonenkonzentration Schwankungen unterliegt, zum anderen ist bekannt, daß neben der N-Glykosidbildung als Nebenreaktion die Selbstkondensation zur Polyribose verläuft. Es wäre nun möglich, daß im Verlauf der Reaktion aus der Polyribose wieder langsam die Zuckerkomponente freigesetzt wird, diese könnte dann mit dem überschüssigen Adenin reagieren und so zum 2. Maximum führen.

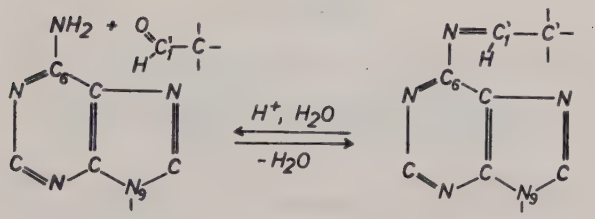
Dieses Verfahren, die Zuckerkomponente tropfenweise zuzusetzen, wurde wieder aufgegeben und nicht weiter untersucht, da es in 2facher Hinsicht ungeeignet erschien. Einerseits waren die Schwankungen der Ausbeute für die präparative Darstellung höchst unerwünscht, andererseits lagen die nach diesem Verfahren erst nach langen Reaktionszeiten erreichten Ausbeuten unter den bisherigen Ergebnissen der Standarddarstellung.

g) Aktivierung des Adenins

Bei den Untersuchungen über die Reaktionsweise des cyclischen Esters konnte gezeigt werden, daß 1 Mol Adenin etwa 2 Mol MPE verbraucht. - Der Schutz der Aminogruppe am C_6 des Adenins durch eine P-O-P-Bindung erfolgt vermutlich sofort, außerdem verbindet sich, wie gewünscht, der Stickstoff in Position N_9 mit einem MPE-Rest. Die Phosphorylierung der Aminogruppe am C_6 des Adenins ist sehr labil und

wird bei der nachfolgenden Aufarbeitung wieder abgespalten. Hätte die Aminogruppe intermediär mit der Ribose reagiert, so wäre nur eine Schiff'sche-Base gebildet worden, die in saurer wässriger Lösung wieder zerfällt.

Abb. 7:



Bei einer Aktivierung des Adenins sind also die stöchiometrischen Mengen an MPE genau einzuhalten. Diese Erkenntnis ist für die Adenosin-Kondensation sehr wichtig, sie muß deshalb in weiteren Synthesen beachtet werden.

Um die Aktivierung besser kontrollieren zu können, wurde nun versucht, Adenin mit MPE umzusetzen und erst später die nicht aktivierte Ribose zuzufügen.
Wie der folgende Versuch zeigt, spielte auch bei dieser Variation der Synthese der pH-Wert eine entscheidende Rolle.
- Man ließ 1 Mol Adenin mit 2 Mol MPE in DMF, das durch Triäthylamin neutral gepuffert war, 1 Std. bei 50° C reagieren.

Erst dann wurden die Reaktionspartner, das aktivierte Adenin und die D-Ribose-Lösung, bei 50° C zusammengegeben und diese Lösung anschließend geteilt. Die Lösung 1 hatte ein Ausgangs-pH von 5,5, die Lösung 2 wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1,5 eingestellt. Beide Lösungen reagierten bei 50° C weiter, und in bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen.

Tabelle 10

Versuche mit Ribose und voraktiviertem Adenin ohne und mit konz. HCl. - Abhängigkeit der Ausbeute vom pH bei 50° C

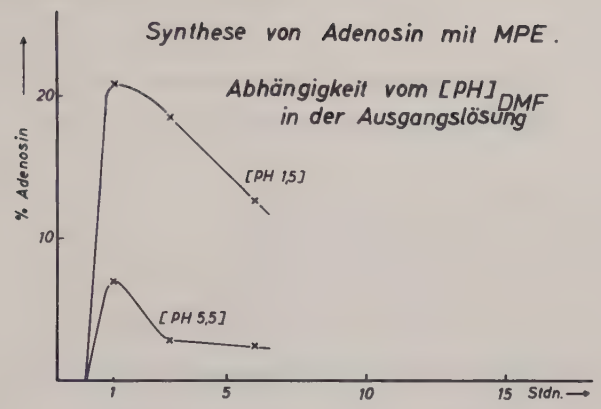
Lösung 1 = Reaktion bei pH 5,5

Zeit (h)	Ausbeute (%)
1	7
3	3
6	2,5

Lösung 2 = Reaktion bei pH 1,5

Zeit (h)	Ausbeute (%)
1	20,8
3	18,5
6	12,7

Abb. 8:



Der Versuch beweist vollauf die Protonenabhängigkeit der Reaktion. Die Voraktivierung des Adenins brachte eine Ausbeute an Adenosin von etwas mehr als 20 % und dies gegenüber der Standarddarstellung schon nach 1 Std. Darüberhinaus nahm die Ausbeute über die Dauer von 2 Stdn. nur geringfügig ab.

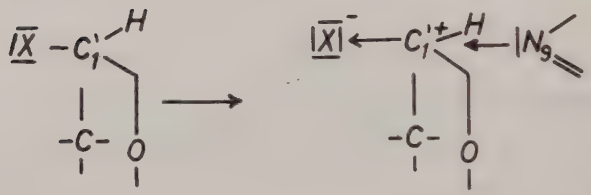
h) Doppelaktivierung des Adenins und der D-Ribose

Nach der geglückten Voraktivierung des Adenins wurde versucht, nun auch die Zuckerkomponente mit dem Ester in eine aktive Form zu überführen.

Die Aktivierung der Halbacetalgruppe mit 1 Mol Äthylphosphat unterscheidet sich schematisch nicht von der Bildung eines C_1^1-Halides. Grundsätzlich verläuft sie so, daß die acetalische Oxygruppe durch einen elektrophilen Rest x substituiert

wird. Dieser elektronenaffine Rest x kann unter Mitnahme des Bindungselektronenpaares als Anion x^- abgelöst werden, dabei geht das C-Atom in ein Carbenium-Kation mit einem Elektronensextett über. Die hierdurch bedingte positive Ladung am C_1'-Atom erleichtert den nucleophilen Angriff des N-Atoms der heterocyclischen Base.

Abb. 9:



Der Reaktionsablauf der Kondensation eines Nucleosides wurde in drei Schritte unterteilt:

1. Aktivierung des Adenins mit MPE
2. Aktivierung der D-Ribose mit MPE
3. Vereinigung und Reaktion der beiden aktivierten Komponenten

Gleichzeitig mit der zuvor beschriebenen Aktivierung des Adenins reagierte in einem zweiten Reaktionsgefäß der Zucker mit einer entsprechend molaren Menge an MPE im Verhält-

nis 1 : 1. Hierdurch ließ sich eine nicht erwünschte Phosphorylierung am C_5 vermeiden. Die Aktivierung der Ribose dauerte bei neutral gepuffertem pH bei 50° C eine halbe Stunde. - Es war wichtig, die Aktivierung bei neutralem pH ablaufen zu lassen, damit die Ribose sich nicht zu Polyribose kondensieren konnte.

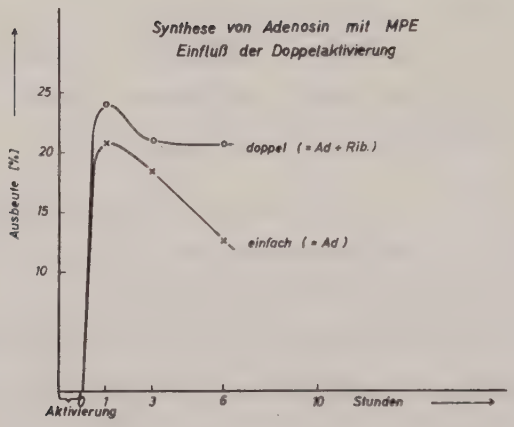
Die beiden aktivierten Lösungen wurden zusammengegeben und mit konz. HCl auf den Ausgangs-pH-Wert von 1,5 eingestellt (= Zeit 0). Bei einer Reaktionstemperatur von 50° C erfolgte die Kondensation zum Adenosin. In mehreren Zeitproben wurde die optimale Reaktionsdauer ermittelt, sie betrug 1 Std.

Tabelle 11

Abhängigkeit der Adenosinausbeute von der Reaktionszeit bei 50° C

	Zeit (h)	pH	Ausbeute (%)
Ausgangs-pH 1,5	1	1,7	24
	3	1,8	21
	6	2,0	20,7

Abb. 10:



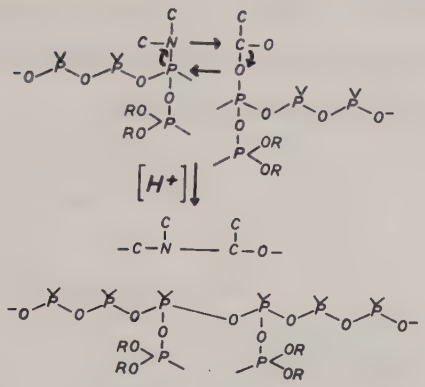
Wie die Kurve zeigt, konnte dank der Doppelaktivierung die Ausbeute einmal noch gesteigert werden, zum anderen wurde das Maximum bereits nach 1 Std. Reaktionsdauer erreicht. Überdies wurde durch diese neuartige Synthese ein schnelles Absinken der Ausbeutenkurve verhindert, denn das Maximum blieb über ca. 6 Stdn. bestehen.

i) Diskussion

Bei der Aktivierung des Adenins in neutraler Lösung entstehen P-N-Bindungen, bzw. Phosphamide. Durch Erhitzen in saurer wässriger Lösung werden diese labilen P-N-Bindungen wieder gespalten unter Bildung der stabilen C-N-Bindung.

Den Reaktionsverlauf könnte man sich durch einen gekoppelten Prozeß erklären.

Abb. 11: Arbeitsmodell



Durch die Substitution des acetalischen OH mit MPE werden die Elektronen vom C_1 in den Phosphorsäurerest hineingezogen. Diese hohe Elektronendichte am Phosphatsauerstoff führt dazu, daß dieser sich mit dem Phosphorsäurerest am N_9 verbindet. Hierdurch wird die labile P-N-Bindung gesprengt. Unter Mitnahme der Bindungselektronen greift der abgetrennte, negativ geladene Stickstoff nun in nucleophiler Reaktion am C_1 an. Im Endeffekt entsteht also aus einer labilen P-N-Bindung und einem ebenfalls labilen tertiären Phosphorsäureester eine verhältnismäßig stabile C-N-Bindung und ein geradkettiger Polyphosphorsäureester. - Dieses angeführte Reaktionsschema ist als Arbeitshypothese anzusehen, solange die Entstehung des geradkettigen Polyphosphorsäureesters nicht bewiesen ist. - Der gekoppelte Prozeß wird durch Protonen katalysiert; an welcher Stelle die Protonen angreifen, ist jedoch nicht einwandfrei geklärt.

Vergleicht man die hier erreichten Ausbeuten an Adenosin mit denen des besten klassischen Verfahrens von J. Davoll (14), so wird ersichtlich, daß mit dem neuen wesentlich einfacheren Verfahren unter geringerem Zeitaufwand die gleichen Ausbeuten erzielt werden können.

3. Synthese von α- und ß-2-Desoxyadenosin

N-9-(1'-α-2-Desoxy-ribosyl)-Adenin und
N-9-(1'-ß-2-Desoxy-ribosyl)-Adenin

Nachdem der Mechanismus der Kondensation bei Adenosin untersucht worden war, wurde nun nach dem günstigsten Verfahren zur Kondensation von Adenin mit 2'-Desoxy-ribose zu 2'-Desoxy-Adenosin gesucht. Da die Eigenschaften des natürlichen 2'-Desoxy-Adenosins bekannt waren, ließ sich das Reaktionsprodukt gut damit vergleichen.

Sämtliche bei der Reaktion auftretenden Produkte mußten wieder genau bestimmbar sein.

a) Charakterisierung der Reaktionsprodukte

Da lange Zeit wegen der erwähnten Empfindlichkeit der Desoxyribose eine Synthese des Nucleosids aus den ungeschützten Komponenten nicht möglich war, ist die gelungene direkte Synthese des Desoxyadenosins mit Hilfe des MPE von großem Interesse.

Zur Charakterisierung der bei der Synthese entstandenen Reaktionsprodukte bot sich als erstes wiederum die Papierchromatographie an. Eine qualitative Bestimmung des entstandenen Substanzgemisches ist damit möglich, jedoch erfolgte die quantitative Auftrennung und Bestimmung der Reaktionsprodukte wieder mit Hilfe der Säulenchromatographie. Diese Säulentrennung wurde über Dowex-1-Formiat-Säulen nach dem von W. Andersen et al. beschriebenen Verfahren (31) durchgeführt. Zunächst wurden die stark basischen Säulen mit

einem Puffer von pH 9,8 eluiert, um das Adenin-desoxyribosid zu erhalten. Die Isolierung des restlichen nicht umgesetzten Adenins erfolgte danach bei pH 8. - Mit Pufferlösung von niedrigerem pH konnten keine phosphorylierten Produkte des Nucleosids erhalten werden. - Das nach der Säulentrennung erhaltene rohe Adenin-desoxyribosid ließ sich wieder in die Ausgangskomponenten Adenin und Desoxyribose spalten.

Die wässrige Lösung des N-Glykosids wurde durch aufeinanderfolgende Fällungen mit Barytwasser und Äthanol von restlichem anorganischen Phosphat bzw. Äthylphosphat weiter gereinigt und dann näher identifiziert.

Papierchromatographisch wurde es u.a. in dem von J.A. Carbon (32) beschriebenen absteigenden System Isopropyläther-Äthanol-H_2O im Mischungsverhältnis 16 : 4,5 : 1 untersucht. Die Chromatographie dauerte 36 bis 48 Stdn., Adenin wurde dabei als Standard benutzt.

Tabelle 12

Produkte	R_f L	R_f C
Adenin	1,0	1,0
9-ß-2'-desoxy-D-ribofuranosyl-adenin	0,60	0,60
9-α-2'-desoxy-D-ribofuranosyl-adenin	0,45	0,45
unbest.Subst. I	-	0,34
" " II	0,28	0,27
" " III	0,17	-
" " IV	0,05	0,05

R_f L = eigene Werte;
R_f C = Vergleichswerte von Carbon

Wie aus der Tabelle 12 hervorgeht, handelte es sich bei dem synthetisierten Adenin-desoxyribosid um ein Anomerengemisch aus α- und ß-Desoxyadenosin, das in seinen R_f-Werten vollkommen mit den von J.A. Carbon (32) gefundenen Werten übereinstimmt. Die schwachen Flecken, bei denen es sich ebenfalls um Kondensationsprodukte handelte, wurden nicht näher untersucht. Das Absorptionsmaximum der Substanzen I und II lag bei 270 mμ.

Das synthetisierte Desoxyadenosin ließ sich nach der Methode von J. Kuszmann und L. Vargha (33) kristallisieren. Das Kristallisat wurde nochmals über eine Kohlesäule gereinigt. Die Elution erfolgte mit Methanol. Aus dieser Methanollösung kristallisierte das Anomerengemisch wieder aus. Zur weiteren Identifizierung wurden seine chemischen Eigenschaften mit denen von natürlichem ß-Desoxyadenosin verglichen.

Tabelle 13

Produkte	R_f 1	R_f 2	R_f 3	UV pH 2 E max. (mμ)	UV pH 2 250/260
ß-Desoxy-adenosin	0,55	0,37	0,60	258	0,83
α-Desoxy-adenosin synth.	-	0,32	0,45		
ß-Desoxy-adenosin	0,55	0,36	0,60	258	0,84
α-Desoxy-adenosin Lit.angaben	-	0,31	0,45		

R_f 1 = Amylalkohol/sekundäres Na-Phosphat in 5 % wässriger Lösung (1 : 1)

R_f 2 = n-Butanol/H_2O

R_f 3 = Isopropyläther-Äthanol-H_2O (16 : 4,5 : 1), als Standard Adenin (R_f Ad = 1,0)

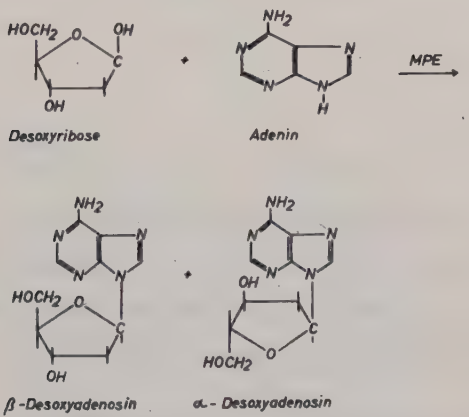
Wie die Tabelle 13 zeigt, wurden chromatographisch stets zwei Banden erhalten, die als α- und ß-Desoxyadenosin identifiziert wurden. Lokalisiert wurden die Banden auf den Chromatogrammen durch ihre Absorption im UV-Licht. Damit konnte experimentell gezeigt werden, daß die Synthese des Desoxyribosids nicht stereospezifisch verläuft. - Die R_f-Werte des synthetisierten ß-Desoxyadenosins stimmen mit denen des natürlichen ß-Desoxyadenosins überein. Die unter R_f 2 angegebenen Werte bestätigen die Ergebnisse von J. Kuszmann und L. Vargha (33). Bei diesem System betrug die Laufzeit beim aufsteigenden Chromatographieren mit wässrigem n-Butanol bei 18° C 20 Stdn. - Die UV-Absorptionskurve ist identisch mit der des natürlichen Desoxyadenosins. Das Extinktionsmaximum bei 260 mμ spricht dafür, daß bei der Kondensation mit MPE die C-N-Bindung am N_9 des Adenins geknüpft wurde.

Die durch Extinktionsmessungen bei 260 mμ bestimmten Ausbeuten beziehen sich stets auf ein Anomerengemisch von rohem α- und ß-Desoxyadenosin. Es galt nun noch, das prozentuale Verhältnis von α- zu ß-Anomeren zu bestimmen. Bei verschiedenen chromatographischen Trennungen ergaben sich geringe Unterschiede an α- und ß-Desoxyadenosin. Die Ergebnisse schwanken zwischen 60 % α- und 40 % ß- und 55 % α- und 45 % ß-Desoxyadenosin, was mit den Ergebnissen von J.W. Carbon (32) übereinstimmt. Die schwankenden Werte an α- und ß-Desoxyadenosin ergaben sich vermutlich aus verschiedenen Reaktionsbedingungen. In jedem Fall aber wurde mehr α- als ß-Desoxyadenosin gefunden.

b) Einfach- und Doppelaktivierung

Die bei der Synthese von Adenosin erworbenen Kenntnisse über die Kinetik der Kondensation konnten hier angewandt werden. - Grundsätzlich wurden Desoxyribose und ein Überschuß an Adenin in salzsaurem DMF mit cyclischem Metaphosphorsäure-Ester umgesetzt.

Abb. 12: Formelbild



Die ersten Versuche zur Darstellung des Desoxynucleosids wurden nach dem Verfahren der Doppelaktivierung bei 50° C durchgeführt. Die Lösungen der Ausgangsprodukte Adenin (1000 mg) und Desoxyribose (200 mg) in DMF wurden mit MPE (2 Mol pro 1 Mol Adenin) getrennt aktiviert. Die beiden aktivierten Lösungen wurden zusammengegeben und mit konz. HCl auf den Ausgangs-pH von 1,5 eingestellt. (= Zeit 0). Das Verhältnis von Adenin zu Desoxyribose betrug 5 : 1, das Gesamtvolumen 150 ml DMF. Hierbei lagen die Ausbeuten

meist bei 10 %, maximal wurden 15 % Desoxynucleosid erreicht. Die in bestimmten Abständen entnommenen Proben wurden jeweils einzeln über Säulen aufgearbeitet.

Tabelle 14

Zeitversuch. Desoxyadenosinausbeute, gewonnen nach dem Verfahren der Doppelaktivierung bei 50° C. Base/Zucker 5 : 1

Zeit (h)	Ausbeute (%)
1	10
3	8,5
6	7,5

Diese geringen Ausbeuten befriedigten nicht. - Ebenso wie bei der nach diesem Verfahren durchgeführten Adenosinsynthese wurde auch hier das Maximum nach 1 Std. erreicht und eine rückläufige Reaktion beobachtet.

Um bessere Ausbeuten zu erzielen, wurde das Verhältnis Adenin/Desoxyribose auf 10 : 1 verändert. Außerdem wurde das Verfahren der einfachen Aktivierung des Adenins dem der Doppelaktivierung des Adenins und der Desoxyribose gegenübergestellt. Um die beiden Verfahren miteinander vergleichen zu können, wurde zunächst Adenin mit MPE umgesetzt und diese Lösung nach der erfolgten Aktivierung geteilt. - Der Lösung 1 wurde die nichtaktivierte Desoxyribose-Lösung zugesetzt. Der Lösung 2 wurde die zuvor ebenfalls mit MPE aktivierte Desoxyribose-Lösung zugegeben. - Beide Lösungen wurden mit konz. HCl auf pH 1,5 eingestellt und reagierten im Glycerinbad bei 50° C. In bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen.

Tabelle 15 und 16

Parallelversuch. Einfache Aktivierung des Adenins und Doppelaktivierung. Base/Zucker 10 : 1. - Abhängigkeit der Desoxyadenosin-Ausbeute von der Reaktionszeit bei 50° C

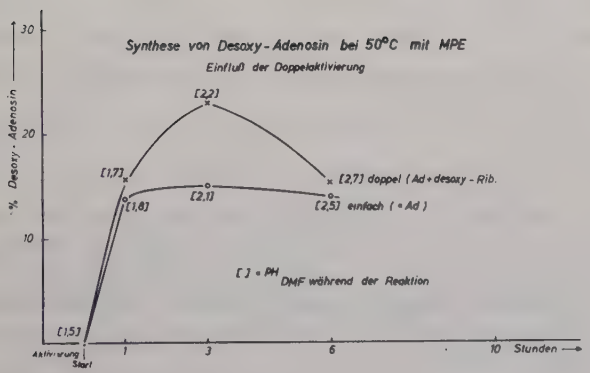
Lösung 1

	Zeit (h)	pH	Ausbeute (%)
Ausgangs-pH 1,5	1	1,8	13,8
	3	2,1	15,0
	6	2,5	14,0

Lösung 2

	Zeit (h)	pH	Ausbeute (%)
Ausgangs-pH 1,5	1	1,7	15,7
	3	2,2	23,0
	6	2,7	15,4

Abb. 13:



Die parallel laufenden Ansätze zeigen, daß durch die Doppelaktivierung eine erhebliche Ausbeutensteigerung auf 23 % erzielt wurde. Darüberhinaus zeigen die Tabellen 14 bis 16, daß durch die Erhöhung des Verhältnisses von Base zu Zucker auf 10 : 1 die Ausbeuten allgemein wesentlich gesteigert werden konnten.

c) Temperaturabhängigkeit

Bei der Desoxyribose wurde stets eine größere Temperatur- und pH-Empfindlichkeit als bei der Ribose beobachtet. Daher erwies es sich als vorteilhaft, die Synthese bei einer Reaktionstemperatur von nur 37° C durchzuführen. Überdies wurde doppelt so viel Lösungsmittel verwendet wie bei den zuvor beschriebenen Ansätzen.

Der erste Versuch bei 37° C brachte nach 24 Stdn. eine Ausbeute von 37,4 % Desoxynucleosid. Daraufhin wurde die Zeitabhängigkeit der Ausbeuten untersucht.

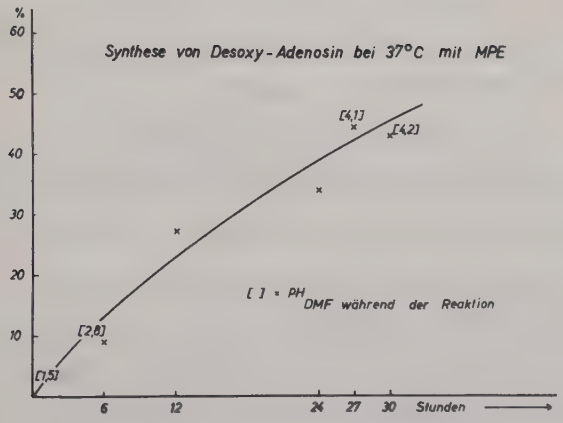
Die 1. Lösung enthielt Adenin und MPE in molarem Verhältnis, gelöst in DMF. Die 2. Lösung bestand aus der Desoxyribose, gelöst in DMF. Beide Lösungen wurden sofort zusammengegeben, mit konz. HCl auf pH 1,5 eingestellt und in ein Glycerinbad von 37° C gebracht. Das Verhältnis Adenin/Desoxyribose wurde mit 10 : 1 festgelegt, das Gesamtvolumen der Reaktionslösung betrug 300 ml DMF. Von der bei konstanter Temperatur (37° C) reagierenden Reaktionslösung wurden in einem Zeitraum von 30 Stdn. Proben entnommen.

Tabelle 17

Abhängigkeit der Ausbeute an Desoxyadenosin von der Reaktionszeit bei 37° C

Zeit (h)	pH	Ausbeute (%)
6	2,8	9,3
12		27,5
24	3,9	34,1
27	4,1	44,5
30	4,2	43,2

Abb. 14:



Die niedrige Reaktionstemperatur hatte wesentlich längere Reaktionszeiten zur Folge. Die langsam aber stetig ansteigende Kurve erreichte erst nach 27 Stdn. ihr Maximum und fiel dann in den nächsten 3 Stdn. kaum ab. Die milden Bedingungen, die sich aus der Temperatur von 37° C, der dop-

pelten Lösungsmittelmenge, der nur molaren Menge an MPE und der dadurch erforderlichen größeren Menge an HCl ergaben, brachten im Vergleich zu den Versuchen bei 50° C wesentlich höhere Ausbeuten. - Es wurde noch nicht geprüft, ob sich durch eine Voraktivierung der Ausgangskomponenten bei 37° C die Ausbeuten weiter steigern lassen.

d) Diskussion

Obgleich das Verfahren der Adenosin-Synthese wegen der Empfindlichkeit der Desoxyribose nicht einfach auf diese übertragen werden konnte, gelang es doch, auch Desoxyadenosin unter geeigneten, abgewandelten Bedingungen aus den ungeschützten Komponenten unter Mitwirkung des MPE in guter Ausbeute zu kondensieren.

Wie T.L.V. Ulbricht zeigte (34), kann wegen des Fehlens der OH-Gruppe am C_2' eine von 2'-Desoxyribose-Derivaten ausgehende Synthese nicht stereospezifisch sein. - Bei dem ersten Versuch, aus den ungeschützten Komponenten mit MPE 2'-Desoxyadenosin darzustellen, hat W. Pollmann (21) diesen nicht einheitlichen Verlauf der Synthese übersehen. Nach papierchromatographischem Vergleich charakterisierte er sein Syntheseprodukt als natürliches ß-2'-Desoxyadenosin. Im Gegensatz hierzu wurde bei sämtlichen Versuchen stets ein Anomerengemisch aus α- und ß-Desoxyadenosin gefunden, in dem das α-Anomere überwog. Durch die Versuchsergebnisse konnte experimentell die Theorie von T.L.V. Ulbricht bestätigt werden.

Die R_f-Werte der beiden Anomeren und von drei weiteren in geringeren Mengen auftretenden Substanzen stimmten gut mit den Befunden von J.W. Carbon (32) überein.

Bei der Kondensation von Desoxyadenosin aus den ungeschützten Komponenten konnten recht gute Ausbeuten erzielt werden. J.A. Carbon erhielt eine Ausbeute von 13 - 19 % an rohem Desoxynucleosid, wenn er von ungeschützten Komponenten ausging. Durch die Kondensation mit einem geschützten Zucker konnte er die Ausbeute auf 28 % an rohem Desoxynucleosid steigern. Dagegen wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren der Doppelaktivierung bei 50° C maximal 23 % erreicht, und durch die milderen Bedingungen bei 37° C konnte die Ausbeute sogar auf 44 % gesteigert werden. Diese relativ hohen Ausbeuten konnten auch mit dem besten klassischen Verfahren von Fletcher et al. (16) nicht erreicht werden. Er erhielt bei größerem Zeitaufwand und zahlreichen Reaktionsschritten nur 29 % des Anomerengemisches.

4. Darstellung anderer Adeninglykoside

Nach den geglückten Synthesen von Adenosin sowie von α- und ß-2'-Desoxyadenosin wurde versucht, mit MPE einige weitere Adeninglykoside darzustellen. Diese wurden, soweit es möglich war, über Anionenaustauschersäulen von der jeweils im Überschuß vorhandenen heterocyclischen Base isoliert, andernfalls mußte die Trennung papierchromatographisch erfolgen. Die Verfahren zur Darstellung mußten entsprechend den Eigenschaften der umzusetzenden Zucker jeweils abgeändert werden.

Abb. 15: Synthese von Adeninglykosiden mit Metaphosphorsäureäthyl-Ester

Adenin + Glucose ⟶ Adenin-Glucosid

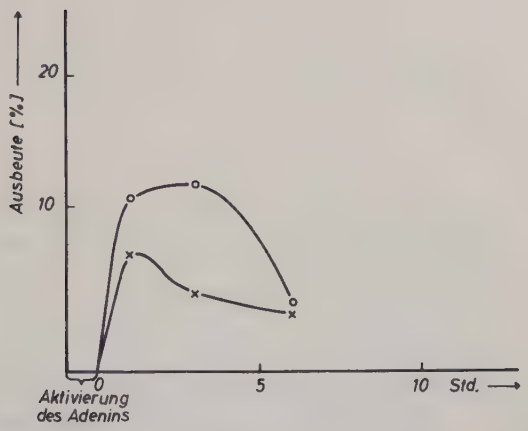
Adenin + Fructose ⟶ Adenin-Fructosid

Adenin + Glucosamin-HCl ⟶ 2'-Desoxy-2'-Amino-Glucosyl-Adenin

a) Synthese eines Adeninglucosids n-9-(1'-ß-glucosyl)-adenin

Bei dem Versuch, ein Adeninglucosid darzustellen, wurde nochmals der Einfluß der Doppelaktivierung untersucht. Ansätze, bei denen nur das Adenin mit dem Ester aktiviert wurde, brachten lediglich Ausbeuten von 7 - 8 %, während durch die Aktivierung beider Ausgangskomponenten, Verhältnis Adenin/Glucose 5 : 1, die Ausbeuten auf 12 % gesteigert werden konnten. Die Ansätze wurden jeweils bei 50° C durchgeführt.

Abb. 16: Synthese von Adeninglucosid bei 50° C mit MPE. Vergleich der Einfach- und Doppelaktivierung



Es müßte möglich sein, durch Variation der Versuchsbedingungen noch bessere Ergebnisse zu erzielen.

Charakterisierung: Das Syntheseprodukt wurde zunächst durch chemische Methoden charakterisiert. Die Perjodat-Titration nach E.L. Jackson (29) ergab einen Verbrauch von etwa 2 Mol Perjodat. Danach konnte eine Phosphorylierung am C_2', C_3' oder C_4' ausgeschlossen werden. - Bei der Aktivierung der Glucose im molaren Verhältnis mit MPE reagierte also nur die Hydroxylgruppe am C_1' der Aldose. - Das entstandene Glucosid reagierte nicht mehr mit Zuckerreagentien und war beständig gegen Alkali, durch Behandlung mit wässriger anorganischer Säure wurde es in Adenin und Glucose zerlegt.

Ein qualitativer Nachweis des Syntheseproduktes erfolgte papierchromatographisch in Pyridin-Butanol-H_2O (1 : 3 : 1). In diesem System konnte durch Entwickeln mit Zuckerreagentien klar unterschieden werden zwischen den einzelnen Zukkerkomponenten, dem Glucosid und einigen schwächeren, langsamer laufenden Banden, bei denen es sich um Oligo- und Polyzucker handelte.

Die quantitative Bestimmung des Nucleosids erfolgte wieder durch säulenchromatographische Auftrennung des Reaktionsansatzes und Messung der Extinktion. Das nach der Säulentrennung durch seine Absorption im UV-Licht nachgewiesene Nucleosid wurde papierchromatographisch mit Adenosin in verschiedenen Systemen verglichen. In einem Durchlaufchromatogramm in n-Butanol-Eisessig-H_2O (5 : 1 : 4) lief die Substanz ähnlich wie das zum Vergleich aufgetragene Nucleosid Adenosin, während die freie Base Adenin wesentlich schneller lief. Daneben wurden langsamer laufende Flecken von kondensierten Nebenprodukten lokalisiert, deren Struktur unbekannt ist. - Der Elutionspunkt und die UV-Absorptionskurve des Kondensationsproduktes sprechen dafür, daß es sich um ein Adeninglucosid handelt. Das Extinktionsmaximum des Nucleosids bei 260 mμ spricht für die N_9-Konfiguration des neu synthetisierten Adeninglucosids. Weitere Versuche zur Konstitutionsermittlung sind erforderlich.

b) Synthese eines Adeninfructosids
N-9-(2'-fructosyl)-adenin

Genauso wie die Aldosen können auch die Ketosen Glykoside bilden. Es sind z.B. α- und ß-Methylfructosid bekannt, die große Ähnlichkeit mit den Glucosiden aufweisen (35). Daher sollte es gelingen, mit dem cyclischen Phosphatester auch ein N-Glykosid der Fructose zu erhalten.

Bei den ersten Versuchen zur Darstellung eines Adeninfructosids wurde die Fructose in DMF langsam in einem Zeitraum von 4 - 5 Stdn. in die Adeninlösung mit MPE unter Rühren zugetropft. Nach 24 Stdn. wurde der Ansatz säulenchromatographisch aufgearbeitet. Bei einem Verhältnis Adenin-Fructose 4 : 1 betrug die Ausbeute an Adenylfructosid nur 11 %. - Mit dem Verfahren der Doppelaktivierung bei 50° C und einem Base-Zucker-Verhältnis von 5 : 1 konnte die Ausbeute des Nucleosids auf 17 % gesteigert werden.

Tabelle 18

Abhängigkeit der Adeninfructosid-Ausbeute von der Reaktionszeit. Doppelaktivierung bei 50° C

Zeit (h)	Ausbeute (%)
1	17
3	15,5
6	12

Vergleichende Ansätze zeigten bei der D-Fructose eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der Reaktionstemperatur, daher konnte schließlich durch Temperaturerhöhung auf 60° C

mit dem Verfahren der Doppelaktivierung die Ausbeute an Adenylfructosid auf 20 % gesteigert werden.

Charakterisierung: Zur Charakterisierung des Syntheseproduktes wurde es einer Säurehydrolyse unterworfen. In hydrolysierter Lösung waren Adenin und Fructose nachweisbar. Die gebildete Fructose wurde neben der zum Vergleich aufgetragenen Fructose papierchromatographisch in dem System Butanol-Pyridin-H_2O (3 : 1 : 1) nachgewiesen durch Besprühen mit Anilinphthalat.

Bei der säulenchromatographischen Trennung entsprach der Elutionspunkt des Adeninfructosids dem des Adeninribosids. Das synthetisierte Adeninfructosid wurde in verschiedenen papierchromatographischen Systemen mit dem Adenosin verglichen.

Tabelle 19

Vergleich des synthetisierten Adeninfructosids mit Adenosin (California Corporation)

	R_f	IR	UV E max.	UV E min.	
Adeninfructosid synth.	0,13-0,15	+	260	240	(pH 6)
Adenosin Cal.Corp.	0,11	+	260	227	(pH 11)

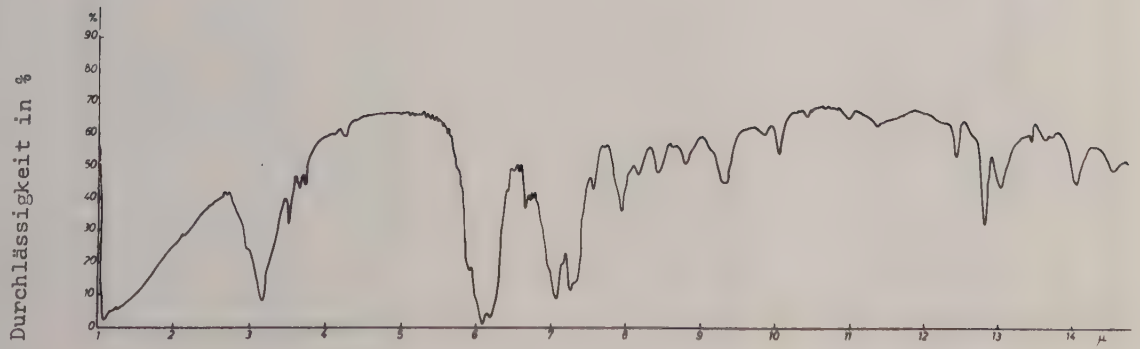
R_f = Amylalkohol/H_2O

Die UV-Extinktionskurve hatte ein Extinktionsmaximum bei 260 mμ. Danach erfolgte die Kondensation der Fructose höchstwahrscheinlich in der N_9-Konfiguration des Adenins.

Schließlich wurden zur Identifizierung des synthetisierten Adeninfructosids die IR-Spektren des Nucleosids, des Adenins und der D-Fructose aufgenommen und miteinander verglichen.

Die Möglichkeit, in dem Spektrum des Fructosids einige Maxima der Fructose und andere dem Adenin zuordnen zu können, spricht dafür, daß die Synthese des bisher unbekannten Adeninfructosids mit MPE tatsächlich gelungen ist.

Abb. 17: IR-Spektrum von synthetisiertem Adeninfructosid



c) Synthese eines Adeninglucosylamids
2'-Desoxy-2'amino-glucosyl-adenin

Zur Reihe der Aminozucker, bei denen ein alkoholisches Hydroxyl durch die Aminogruppe ersetzt ist, zählt das D-Glucosamin. Dieses D-Glucosamin ist eine starke Base und wird bei der Gewinnung gewöhnlich als Hydrochlorid erhalten. Die Aminozucker geben noch die Reaktionen der Carbonylgruppe. Da Glykoside des Glucosamins (36) bekannt sind, sollte es auch gelingen, mit dem cyclischen Metaphosphorsäure-Ester ein N-Glykosid des Glucosamins zu erhalten.

Bei der Kondensation des Amino-N-Glykosids reagierten Adenin und Glucosamin-HCl nach dem Verfahren der Doppelaktivierung bei 50° C miteinander. Das Verhältnis von Base zu Zucker betrug 5 : 1. Als Lösungsmittel wurde DMF verwendet. Es konnte in guter Ausbeute ein Nucleosid gewonnen werden. - In einigen Ansätzen wurde das Lösungsmittel variiert und Dimethylsulfoxyd verwendet. In Dimethylsulfoxyd konnten die Ausbeuten noch etwas gesteigert werden. Da sich aber das Dimethylsulfoxyd bei der Aufarbeitung nicht abdestillieren läßt, fand dieses Lösungsmittel keine weitere Anwendung.

Charakterisierung: Die Säurehydrolyse des Syntheseproduktes ergab wieder die Ausgangskomponenten. - Zur weiteren Charakterisierung wurde das synthetisierte Nucleosid in verschiedenen chromatographischen Systemen mit Adenosin verglichen. Besonders gut eignete sich n-Butanol-Eisessig-H_2O (5 : 1 : 4). In sämtlichen Systemen verhielt sich das synthetisierte 2'-Desoxy-2'-amino-glucosyl-Adenin ähnlich wie das zum Vergleich aufgetragene Adenosin. Die freie Base Adenin lief

deutlich schneller. Daneben wurden noch schwächere Extinktionsflecken lokalisiert, die langsamer liefen als das Syntheseprodukt. - Die UV-Extinktionskurve hatte ein Extinktionsmaximum bei 267,5 mμ. Zur Konstitutionsermittlung des Nucleosids sind genauere Untersuchungen erforderlich.

Bei der Darstellung dieser angeführten Adeninglykoside ging es allein darum, zu prüfen, inwieweit sich das Verfahren, ohne Schutzgruppen mit MPE Nucleoside darzustellen, auf andere Zucker ausdehnen läßt. In allen Beispielen ist die Kondensation grundsätzlich gelungen. Dabei wurde das Syntheseverfahren jeweils entsprechend den chemischen Eigenschaften der Zucker abgewandelt. Eine genaue Untersuchung der Struktur der neuen Syntheseprodukte muß noch durchgeführt werden.

5. Darstellung anderer Riboside

Nach den Kondensationsversuchen von Adenin mit verschiedenen Zuckern wurde nun die Verknüpfung einiger anderer Basen mit Ribose geprüft. Dabei wurden die drei folgenden Reaktionen näher untersucht.

Abb. 18: Synthese von Ribosiden mit MPE

8-Azaguanin + Ribose ⟶ 8-Azaguanosin

Evipan + Ribose ⟶ Evipan-Ribosid

Uracil + Ribose ⟶ Uridin

a) Synthese von 8-Azaguanosin
N-9-(1'-ß-ribosyl)-8-Azaguanin

Zu den Analoga der Purine zählt das 8-Azaguanin, bei dem das C_8 durch ein N ersetzt ist. Das 8-Azaguanin besitzt großes Interesse wegen seiner antibiotischen und cytostatischen Wirkung.

Die ersten Versuche zur Darstellung von 8-Azaguanosin wurden nach der Standarddarstellung durchgeführt. Das Verhältnis von Base zu Zucker betrug 5 : 1. Die Ausbeuten lagen bei 5 - 8 %, sie ließen sich durch die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 60° C nicht steigern. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Abdestillation des Lösungsmittels entweder säulenchromatographisch über Dowex-1-Formiat-Säulen, wobei zuerst bei neutralem pH das nicht umgesetzte 8-Azaguanin ausfiel, oder die wässrige Reaktionslösung wurde zur Reinigung von dem nicht umgesetzten 8-Azaguanin nur mehrmals

mit dem Austauscherharz geschüttelt und dann abfiltriert. Zur Entfernung von restlichem Phosphat wurde das Filtrat anschließend noch mit Barytwasser und Äthanol behandelt.

Charakterisierung: Das isolierte Nucleosid wurde durch Säurehydrolyse wieder in 8-Azaguanin und Ribose gespalten. - Zur weiteren Identifizierung wurde die Substanz papierchromatographisch in verschiedenen Systemen mit natürlichem Guanosin (9-N-(1'-ß-ribosyl)-guanin) verglichen. In dem System Amylalkohol/sekundäres Natriumphosphat in 5 % wässriger Lösung (1 : 1) wurde für das neu synthetisierte 8-Azaguanosin ein R_f-Wert von 0,67 - 0,68 ermittelt, der R_f-Wert von Guanosin ist 0,66. Papierchromatographisch wurden auch hier Nebenprodukte festgestellt. - Die UV-Extinktionskurve hatte bei neutralem pH ihr Maximum bei 260 mμ, woraus auf eine N_9-Konfiguration des Nucleosids geschlossen werden kann.

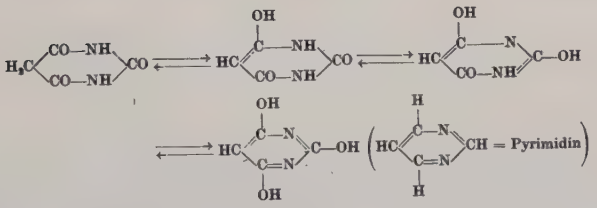
Biologische Tests mit dem synthetisierten Azaguanosin sind beabsichtigt. Es soll u.a. untersucht werden, inwieweit es möglich ist, Azaguanosin anstelle von Guanin in die Transfer-RNS einzubauen.

b) Synthese eines Evipan-Ribosids
D-Ribosyl-Evipan

Von der Barbitursäure leiten sich wichtige Schlaftmittel ab. Sie selbst ist eine starke Säure. Diesen Säurecharakter verdankt die Barbitursäure der aktiven Methylengruppe des Malonesters, da hierdurch die Enolisierung am benachbarten Carbonyl erreicht wird. Die starke Acidität der Bar-

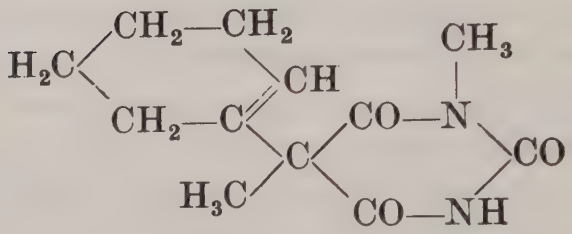
bitursäure verschwindet, wenn die beiden H-Atome der CH_2-Gruppe substituiert werden. Die beiden NH-CO-Gruppierungen können ebenfalls tautomer reagieren, indem sich anstelle der Lactamgruppierung-NH-CO die Lactimgruppierung -N=C-OH einstellt. So kann die Barbitursäure in einer tautomeren Form als Trioxypyrimidin erscheinen (37).

Abb. 19:



Das Barbitursäure-Derivat Evipan (Methyl-cyclo-hexenyl-N-methylbarbitursäure) ist ein bekanntes Einschlafmittel. - Da nur noch eine N-H-Gruppe frei ist und das Evipan als substituiertes Pyrimidin angesehen werden kann, sollte auch hier die N-Glykosidbildung mit Ribose möglich sein.

Abb. 20: Evipan (Methyl-cyclo-hexenyl-N-methyl-barbitursäure)



In den durchgeführten Versuchen wurde Evipan stets nach dem Verfahren der Doppelaktivierung bei 50° C mit Ribose im Verhältnis 5 : 1 umgesetzt. Wieder wurde nur 1 Mol MPE pro Mol Evipan verwendet. Bei der Aufarbeitung fiel nach Entfernung des Lösungsmittels in wässriger Lösung das nicht umgesetzte Evipan vollständig aus. Hierbei betrug die Ausbeute des neu synthetisierten Evipan-Ribosids 25 %, bezogen auf den eingesetzten Zucker.

Charakterisierung: Zur Charakterisierung wurde das klare Filtrat papierchromatographisch untersucht. In sämtlichen Systemen verhielt sich das Syntheseprodukt ähnlich wie das zum Vergleich aufgetragene Adenosin. In Amylalkohol/sekundärem Natriumphosphat in 5 % wässriger Lösung (1 : 1) hatte das neue Ribosid einen R_f-Wert von 0,56, Evipan 0,11 und das Nucleosid Adenosin 0,53. - Auch hier wurden schwache Flecken von langsamer laufenden Substanzen festgestellt.

Gegenüber dem bekannten Evipan bietet das Syntheseprodukt den Vorteil der Wasserlöslichkeit, die sonst nur beim Natriumsalz des Evipans erreicht wird. In ihren chemischen Eigenschaften entsprach die neue Substanz erwartungsgemäß einem Ribosid des Evipans. Die Säurehydrolyse ergab wieder Evipan und Ribose. Danach ist sicher, daß durch den cyclischen Ester eine Kondensation erfolgte. Eine Konstitutionsermittlung des Ribosids muß sich anschließen, um festzustellen, ob sich tatsächlich das N-Glykosid gebildet hat. Eine pharmakologische Prüfung dieses erstmals hergestellten Evipan-Ribosids ist beabsichtigt.

Bei diesen beiden beschriebenen Ribosiden bestand die Aufgabe auch nur darin, zu prüfen, ob die Kondensation mit Hilfe des MPE grundsätzlich möglich ist. Die Kondensation ist gelungen. - Es müssen sich jetzt Konstitutionsermittlungen anschließen, die durch das Fehlen der Vergleichssubstanzen erschwert werden. Daher können erst Strukturanalysen Aufschluß über die genaue Verknüpfung der Komponenten geben. Außerdem müssen noch die günstigsten Reaktionsbedingungen ausgearbeitet werden.

c) Synthese von Uridin
N-3-(1'-ß-ribosyl)-uracil

Außer den bisher verwendeten Purinbasen und dem Barbitursäure-Derivat lassen sich prinzipiell auch Pyrimidinbasen durch MPE mit einem Zucker zu Nucleosiden verknüpfen. Allerdings besitzen die Pyrimidine nur eine geringe Reaktionsfähigkeit, daher ist die Kondensation schwierig. Die geknüpfte N-Glykosidbindung mit einer Pyrimidinbase ist dann aber stabiler als bei den zuvor beschriebenen Purinnucleosiden.

Die Reaktionsträgheit der Pyrimidinbase machte es erforderlich, die Aktivierungszeit für Uracil mit MPE zu erhöhen. Deshalb wurde Uracil 3 Stdn. bei 50° C mit MPE in molarem Verhältnis voraktiviert. Wahrscheinlich reagierte nur das N_3 des Uracils mit einer P-O-P-Bindung. Das derartig voraktivierte Uracil wurde mit voraktivierter Ribose im Verhältnis 5 : 1 bei 50° C zur Reaktion gebracht. Es wurde in geringen Ausbeuten von 5 - 8 % ein Nucleosid erhalten.

Charaktierisierung: Zur Charakterisierung wurde das synthetisierte Nucleosid in verschiedenen papierchromatographischen Systemen mit natürlichem Uridin verglichen, dabei wurden stets die gleichen R_f-Werte wie beim natürlichen Uridin erhalten: in n-Butanol/H_2O betrug der Wert für Uridin 0,21 (theoretisch), für Uracil 0,32 (theoretisch) und für synthetisiertes Uridin 0,20. Daneben wurden noch schwächere, langsamer laufende Flecken beobachtet. - Die UV-Extinktionskurve hatte ein Extinktionsmaximum bei 262 mμ, was mit dem des natürlichen Uridins übereinstimmt.

6. Versuche mit künstlichen Pyrimidinbasen

a) Versuche mit 5-Bromuracil

Für eine vorgesehene Kondensation von 5-Bromuracil mit 2'-Desoxyribose zu 5-Brom-2'-Desoxyuridin wurde zunächst in Vorversuchen die Stabilität des Bromuracils gegenüber dem Katalysator MPE geprüft. Dabei wurde festgestellt, daß sich bei der Aktivierung von 5-Bromuracil über mehrere Stunden bei 50° C die Base nicht veränderte. Das mit MPE in molarem Verhältnis behandelte 5-Bromuracil lief chromatographisch genauso wie die unbehandelte bromierte Base. Daneben war noch ein schwacher, langsamer laufender Fleck zu beobachten. Das überdies aufgetragene, schneller laufende Uracil unterscheidet sich im Chromatogramm deutlich vom 5-Bromuracil. - Hiernach ist also die Stabilität ausreichend, um nach einem geeigneten Verfahren das entsprechende Nucleosid zu erhalten, was bis jetzt noch nicht gelang.

b) Versuche mit Trifluorothymin

Einige vorläufige Versuche wurden auch mit dem Trifluorothymin (F_3T) durchgeführt. Beide Substanzen, die Base F_3T wie auch das Trifluorothymin-Desoxyribosid, sind gegenüber schwachen Alkalien sehr unstabil. Das 5-Trifluoromethyluracil-Desoxyribosid (F_3TDR) ist auch nach klassischen Verfahren nur sehr schwer zugänglich (38). - Bei der Aktivierung der Base mit MPE konnte papierchromatographisch keine Veränderung festgestellt werden.

Die Kondensation des aktivierten F_3T mit Desoxyribose wurde nach dem Verfahren der Doppelaktivierung bei 50° C und einem Basen-Zucker-Verhältnis von 10 : 1 versucht. Leider gelang es nicht, das gewünschte Nucleosid zu synthetisieren. Papierchromatographisch wurden in verschiedenen Systemen jeweils zwei Banden von Kondensationsprodukten lokalisiert, deren Struktur noch unbekannt ist. Sie liefen beide langsamer als das zum Vergleich aufgetragene F_3TDR. - Vermutlich ist eine Reaktion mit der Pyrimidinbase eingetreten, wofür die Farbreaktionen bei den chromatographischen Untersuchungen sprechen. Jedoch besitzt keines der Kondensationsprodukte die erwartete Struktur der Vergleichssubstanz, des Desoxyribosids F_3TDR.

Die Methode der Kondensation mit Hilfe des Metaphosphorsäureäthyl-Esters ließ sich auch auf Pyrimidine anwenden. Doch müssen hier sicher die Aktivierungszeiten erhöht und die Versuchsbedingungen abgewandelt werden. Dazu sind noch zahlreiche kinetische Untersuchungen erforderlich.

III. Experimenteller Teil

1. Darstellung des Metaphosphorsäureäthyl-Esters

150 g analysenreines, möglichst fein gepulvertes P_4O_{10} (Riedel de Haen, p.a. oder Fluka AG., p.a.) wurden mit 250 ml Chloroform, das zuvor über $CaCl_2$ und P_4O_{10} getrocknet wurde, und 200 ml absolutem Äther in einem Schliffkolben am Rückfluß unter Rühren gekocht. Die Badtemperatur betrug 65° C. Nach 20 - 24 Stdn. hatte sich das P_4O_{10} klar gelöst. Die Lösung wurde zunächst durch Glaswolle filtriert und danach das Lösungsmittel abdestilliert. Es blieb der nahezu farblose, zähflüssige Metaphosphorsäureäthyl-Ester (MPE) zurück. Es empfiehlt sich, kristallines P_4O_{10} zuvor selbst zu sublimieren. Die letzten Reste des Lösungsmittels waren nur schwer von dem Ester zu entfernen. Die Bestimmung der Ausbeute durch Wiegen war daher nur ungenau. Sie lag im allgemeinen bei 80 - 90 %.

Das Molekulargewicht (MG) wurde zu 432,15 berechnet.

Als Kriterium für die Brauchbarkeit des Esters wurde der pH-Wert in Dimethylformamid (DMF) bestimmt. Zur pH-Messung in DMF diente die kombinierte Kalomel-Glaselektrode GK 2026 C, GH von der Firma Radiometer, Kopenhagen. Die Kalomel-Elektrode stand nur durch ein kleines Diaphragma mit der Außenlösung in leitender Verbindung. 1 g MPE wurde in 50 ml DMF gelöst und an der Glaselektrode der pH-Wert festgestellt.

Ein Ester mit dem pH 2 war zu den Synthesen wesentlich besser geeignet als ein Ester vom pH 1. Dieser war meist schon weitgehend durch Spaltung inaktiviert. - Überdies verlor MPE an Aktivität durch Feuchtigkeitsaufnahme, wenn es an offener

Luft gestanden hatte. Daher war die Aufbewahrung in kleinen, gut verschlossenen Gefäßen in der Tiefkühltruhe bei -15° C erforderlich.

2. Herkunft von Basen und Zuckern

Zur Darstellung der Nucleoside wurden folgende Ausgangssubstanzen benutzt:

Adenin (Reinheitsgrad A) der California Corporation for Biochemical Research

5-Bromuracil (Reinheitsgrad C) der California Corporation for Biochemical Research

8-Azaguanin der Firma Sigma Chemical Company, St. Louis

Uracil purissimum von Fluka AG., Buchs/Schweiz

Evipan der Farbenfabriken Bayer

D-Ribose, chromatographisch rein, Mann Research Laboratories, New York

2-Desoxy-D-Ribose (Reinheitsgrad A) der California Corporation

D-Glucose, chemisch rein, von Riedel de Haen AG

D-Fructose, chemisch rein, von Riedel de Haen AG

D-Glucosamin-hydrochlorid von Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio

Die als Bezugssubstanzen verwendeten Nucleoside Adenosin und 2-Desoxyadenosin (Reinheitsgrad A) stammten von der California Corporation.

Für die freundliche Überlassung von 5-Trifluoromethyl-uracil (F_3T) und 5-Trifluoromethyl-2'-desoxy-uridin (F_3TDR) danke ich Herrn Professor Charles Heidelberger, Madison, USA.

3. Darstellung von Adenosin

a) Standarddarstellung

1000 mg Adenin (MG 135,11) wurden mit 0,5 ml konz. HCl in 100 ml DMF gelöst und mit 3 g MPE (MG 432,148) versetzt. In einem 2. Reaktionsgefäß erfolgte die Lösung von 200 mg D-Ribose (MG 150,135) in 50 ml DMF. Die beiden Lösungen,

Verhältnis Adenin/Ribose 5 : 1, wurden zusammengegeben, die Reaktionstemperatur lag bei 50 - 55° C. Nach 3 Stdn. wurde die Reaktion beendet. Die präparative Aufarbeitung des Ansatzes konnte nach zwei Methoden erfolgen.

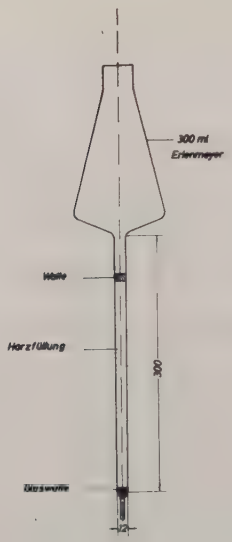
α) Aufarbeitung durch Fällung mit Äther-Chloroform

Das Reaktionsgemisch wurde sofort in eine Äther-Chloroform-Mischung (1 : 1) gegeben. Hierbei gingen nicht umgesetztes MPE und DMF in Lösung. Nach mehrstündigem Stehen der Lösung bei 0° C wurde das Chloroform von den ausgefallenen Produkten (Adenin, Adenosin, Adenylsäure und Phosphate) abdekantiert und der Rückstand in 100 ml H_2O aufgenommen. Danach konnten die Phosphate mit $Ba(OH)_2$ ausgefällt werden. Anschließend wurde zu der klaren, wässrigen Lösung die gleiche Menge Äthanol gegeben. Durch Abzentrifugieren nach einer halben Stunde konnten die restlichen Äthylphosphate entfernt werden. Die saure Lösung wurde mit 2 n-NaOH neutralisiert und einige Stunden stehen gelassen. Hierbei fiel nach Animpfen mit wenig Adenin der größte Teil der nicht umgesetzten Base bei 0° C aus. Die Mutterlauge enthielt neben Resten an Adenin in der Hauptsache Adenosin und Adenylsäure sowie außerdem Salze. Dieses Gemisch mußte nun noch über Säulen getrennt werden.

ß) Herstellung der Ionenaustauscher-Säulen

Für die Säulenchromatographie wurden spezielle Glasrohre verwendet. (Vergleiche Abb. 21). Als Säulenfüllung diente die Formiatform von Dowex 1 x 10,200 - 400 mesh. Die Harzpräparation geschah in Anlehnung an das Verfahren von Hurlebert et al. (39). Hierzu wurde das in der Chloridform

Abb. 21: Glasrohr für Ionenaustauscher-Chromatographie (40).



vorliegende Harz durch mehrmaliges Aufschlämmen mit Wasser von den kleinsten Harzpartikeln befreit. - Dieser Schritt war wichtig, um die Durchlaufgeschwindigkeit der Säulen etwas herabzusetzen. - Nachdem das Harz relativ einheitlich sedimentierte, wurden Cl-Ionen des Harzes durch 3 m-Ammoniumformiat-Lösung verdrängt. Das mit Wasser nachgewaschene Harz wurde nun in die unten mit etwas Glaswatte verschlossenen Säulen möglichst einheitlich etwa 20 cm hoch gegossen. - Kürzere Säulen verschlechterten den Trenneffekt merklich. - Vor Gebrauch wurden die Säulen mit 200 cm^3 einer Mischung aus 6 n-Ameisensäure und 1 n-Ammoniumformiat (1 : 1), dann mit 150 cm^3 88-prozentiger Ameisensäure und schließlich mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen.

Nach erfolgter Aufarbeitung eines Ansatzes wusch man das Harz jeweils wieder mit 200 cm^3 88-prozentiger Ameisensäure und anschließend mit Wasser. Das Harz konnte erneut für Versuche verwendet werden, doch erwies es sich als zweckmäßig, zur Auflockerung des Harzes die Säulen jeweils neu zu gießen.

Über derartig vorbereitete Säulen wurden die von den Nucleosidansätzen jeweils zu verschiedenen Zeiten entnommenen Proben aufgearbeitet. Wenn es galt, ganze Ansätze aufzuarbeiten, dann wurden entsprechend größere Säulen verwendet.

γ) Aufarbeitung über die Dowex-1-Formiat-Säule

Bevor der Ansatz über Säulen aufgetrennt wurde, saugte man das DMF aus der Reaktionslösung unter vermindertem Druck ab. Der zähflüssige Rückstand wurde in 50 ml H_2O aufgenommen, die stark saure Lösung sofort mit 2 n-NaOH neutralisiert und über Nacht bei 0^o C stehengelassen. Hierbei fiel der größte Teil der nicht umgesetzten Base aus. Die Mutterlauge enthielt neben Adenin und Adenosin noch etwas Adenylsäure, unbekannte Substanzen und außerdem Salze.

Die weitere Abtrennung des Adenosins erfolgte nach W.E. Cohn (26) über eine Dowex-1x10-Formiat-Säule, 200 - 400 mesh. Die Dowex-Säule wurde mit 0,01 m-Formiat-Ammoniak-Puffer vom pH 11 äquilibriert. Die filtrierte Mutterlauge wurde mit konz. Ammoniak ebenfalls auf pH 11 eingestellt und dann auf die Säule gegeben. Das Adenosin eluierte man mit 0,01 m-Formiat-Ammoniak-Puffer bei pH 10,2. Anschließend erfolgte die Isolierung des nicht umgesetzten Adenins bei pH 8,25 und die der Adenylsäure bei pH 2,75 jeweils mit 0,01 m-Formiat-Ammoniak-Lösung als Elutions-

puffer. Zu dieser säulenchromatographischen Auftrennung wurde ein automatischer Fraktionssammler verwendet.

Die säulenchromatographisch und durch Extinktionsmessungen bestimmte Ausbeute an Adenosin, bezogen auf die eingesetzte Ribosemenge, lag bei 20 %.

b) Reinigung

Die wässrige Lösung des Syntheseproduktes wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen. Aus dieser Lösung wurden durch Zusatz von Barytwasser restliche anorganische Phosphate ausgefällt. Durch Versetzen des klaren Filtrates mit Äthanol konnte noch Äthylphosphat ausgefällt und abzentrifugiert werden.

c) Kristallisation

Das synthetisierte rohe Adenosin wurde mit Natriumbicarbonat-Lösung auf einem Filter gewaschen bis es farblos war und anschließend getrocknet. Die Substanz wurde dann mit 20 ml einer methanolischen Ammoniaklösung versetzt, über 12 Stdn. bei 0° C aufbewahrt und danach wieder bis zur Trockne eingeengt. Aus dem mit etwa 2 ml H_2O aufgenommenen Rückstand kristallisierte schließlich das N-9-(1'-ß-ribosyl)-adenin aus.

d) Säurehydrolyse

20 mg des synthetisierten Adenosins wurden mit 4 ml Salzsäure (4 %) am Rückfluß 2 Stdn. bei 85° C behandelt. - In der hydrolysierten Lösung konnten papierchromatographisch Adenin und D-Ribose nachgewiesen werden.

e) Durchführung der kinetischen Untersuchungen

In weiteren Versuchen, die ebenfalls genau nach der unter a) beschriebenen Standarddarstellung durchgeführt wurden, entnahm man zu bestimmten Zeiten Proben, und zwar jeweils 30 ml nach 20 Minuten, 1, 3, 6 und 9 Stdn.

Die quantitative Aufarbeitung erfolgte ausschließlich nach dem unter a) bei γ) beschriebenen Verfahren. Die Proben wurden jeweils einzeln aufgearbeitet und die Substanzgemische über 5 kleine Dowex-1-Formiat-Säulen aufgetrennt.

f) Ausbeutenbestimmung

Die aufgearbeitete Probe (z.B. zweite von fünf Zeitproben, entnommen nach 3 Stdn.) erbrachte eine Ausbeute von 20,5 % Adenosin, bezogen auf die eingesetzte Ribosemenge.

Dieser Ausbeutenangabe lag folgende stöchiometrische Berechnung zugrunde:

Molekulargewicht D-Ribose: 150,135

Molekulargewicht Adenosin: 267,24

Adenosin E_{max} (bei 260 mμ, pH 11) = 14,9

$$\frac{267,24}{14,9} = 18$$

Die Summe der gemessenen Extinktionen der Zeitprobe (Verdünnung 1 : 10) betrug 5,40.

Bei einer Ausgangsmenge von 200 mg D-Ribose entsprächen 356 mg synthetisiertes Adenosin = 100 %.

Die Zeitprobe enthielt 1/5 der insgesamt eingesetzten Menge an D-Ribose; demnach entsprächen 71,2 mg synthetisiertes Adenosin pro Zeitprobe = 100 %.

Die gemessene Extinktion entsprach 14,58 mg Adenosin = 20,5 %.

g) Veränderung der Reaktionstemperatur und des Mengen-Verhältnisses Adenin/Ribose

Abweichend von der Standarddarstellung wurden Reaktionen bei der Temperatur von nur 37° C durchgeführt. Dazu löste man 1000 mg Adenin mit 3,5 g MPE in 250 ml DMF durch magnetisches Rühren und versetzte die Lösung anschließend mit 100 mg D-Ribose, gelöst in 50 ml DMF. Die Reaktionslösung (Verhältnis Adenin/Ribose = 10 : 1) wurde mit konz. HCl auf pH 1,5 in DMF eingestellt. Die Messung des pH-Wertes erfolgte mit der Spezialglaselektrode. Von der Lösung wurden nach 10, 21, 24, 27, 30 und 33 Stdn. jeweils 50 ml zur Bestimmung entnommen.

h) pH-Abhängigkeit der Reaktion

Um den Einfluß des pH feststellen zu können, verzichtete man auf die konz. HCl. Das Adenin wurde in DMF suspendiert, und nach Zugabe von MPE erhielt man schließlich eine klare Lösung. Damit hatte man anstelle des stark sauren Ausgangs-pH-Wertes von 1,2 einen pH-Wert von etwa 2 erreicht. Im übrigen erfolgte die Synthese (50° C) wie bereits bei a) beschrieben. Die Ausbeute betrug jedoch nach 3 Stdn. nur 4 %.

In der gleichen Weise ohne HCl aber bei 37° C durchgeführte Versuche brachten ebenfalls nur sehr schlechte Ausbeuten.

Anschließend wurden weitere Ansätze ohne HCl bei 50° C mit 3 ml Tributylamin auf ein Ausgangs-pH von 7,5 gepuffert. Proben wurden nach 12, 15, 18, 21 und 27 Stdn. entnommen

und das DMF wie üblich abdestilliert, wobei das Tributylamin zurückblieb. Nach der Aufnahme der Proben in H_2O betrug das pH 3,5 - 4 (bei vorherigen Ansätzen ohne Tributylamin etwa 1). Die Proben wurden mit 2 n-KOH neutralisiert. Mit etwas konz. NH_3 fiel das Tributylamin aus, das dann mit Äther ausgeschüttelt werden konnte. Nachdem der Äther restlos entfernt worden war, wurden die Proben in üblicher Weise mit konz. NH_3 auf pH 11 eingestellt und über Dowex-Säulen aufgearbeitet. Die Proben ergaben nur sehr schwache Ausbeuten von maximal 3,5 % Adenosin.

Als weitere Änderung wurden HCl-haltige Ansätze, die einen Ausgangs-pH-Wert von 1,2 hatten, mit Triäthylamin als Puffer auf ein pH von 1,5 eingestellt. Die übrigen Bedingungen blieben konstant. - Die Verwendung von Puffer ergab eine wesentlich günstigere Abhängigkeit der Ausbeuten von der Zeit (Vergleiche Seite 28).

i) Untersuchungen über die Aufspaltung von Adenosin

150 mg Adenosin wurden mit 300 mg MPE in 150 ml DMF gelöst. Die Lösung hatte einen pH von 2,5. Durch Zugabe von 0,25 ml Triäthylamin wurde sie neutral gepuffert und danach mit 0,5 ml konz. HCl auf einen pH-Wert von 1,5 eingestellt. Von dieser Lösung wurde beim Start eine Probe von 30 ml entnommen, die restliche Reaktionslösung wurde in ein Glycerinbad von 52° C gebracht. Ihr wurden nach 1, 3, 6 und 10 Stdn. weitere Proben von je 30 ml entnommen.

Im Verlauf der Reaktion entstandenes freies Adenin und freie Ribose wurden durch vergleichende Chromatographie nachgewiesen. Außerdem war die UV-Extinktionskurve des

entstandenen freien Adenins mit der des Vergleichs-Adenins identisch.

k) Tropfenweise Zugabe der Ribose

1000 mg Adenin wurden mit 0,5 ml konz. HCl in 100 ml DMF gelöst und mit 3 g MPE versetzt. In einem Zeitraum von 4 - 5 Stdn. wurden 200 mg D-Ribose, gelöst in 50 ml DMF, unter magnetischem Rühren hinzugetropft. Nach einer Reaktionsdauer von etwa 20 Stdn. bei 50 - 55° C wurde der Ansatz aufgearbeitet.

Unter denselben Bedingungen wurden in weiteren Ansätzen zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen, um die Adenosin-Ausbeute über 30 Stdn. verfolgen zu können. Die einzelnen Proben wurden, wie unter a) bei γ) beschrieben, säulenchromatographisch aufgearbeitet.

l) Aktivierung des Adenins

1000 mg Adenin und 7 g MPE wurden in 100 ml DMF unter magnetischem Rühren gelöst. Dann fügte man wasserfreies Triäthylamin bis zu einem pH von 7 hinzu. Diese Lösung reagierte bei 50° C 1 Std. Danach wurden 200 mg D-Ribose, gelöst in 50 ml DMF, zugegeben. Die Reaktionslösung hatte nun einen pH-Wert von 5,5. Sie wurde in 2 Lösungen von je 75 ml geteilt.

Lösung 1 reagierte bei pH 5,5 und einer Temperatur von 50° C. Nach 1, 3 und 6 Stdn. wurden Proben zu je 25 ml entnommen und in der üblichen Weise über Dowex-Säulen aufgearbeitet. Die Ausbeuten waren sehr gering.

Lösung 2 wurde mit konz. HCl auf pH 1,5 eingestellt. Sie reagierte ebenfalls bei 50° C. In den gleichen Zeitabständen wie bei 1 wurden Proben entnommen. Die Ausbeuten lagen bei 20,8 % Adenosin nach 1 Std. (Vergleiche Seite 34).

m) Doppelaktivierung des Adenins und der Ribose

500 mg Adenin und 3,5 g MPE wurden in 50 ml DMF unter magnetischem Rühren gelöst. Dann wurde wasserfreies Triäthylamin bis zu einem pH von 7 zugefügt. Anschließend ließ man die Lösung bei 50° C 1 Std. reagieren. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 100 mg D-Ribose in 25 ml DMF gelöst, 350 mg MPE zugefügt und das pH mit Triäthylamin auf 7 eingestellt. Diese Mischung reagierte nur eine halbe Stunde.

Beide Lösungen wurden zusammengegeben und mit einigen Tropfen konz. HCl (etwa 0,5 ml) auf pH 1,5 eingestellt. Nach einer Reaktionsdauer von 1, 3 und 6 Stdn. bei 50° C wurden je 25 ml entnommen. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte, wie unter a) bei γ) beschrieben, nach W.E. Cohn über Dowex-1-Formiat-Säulen (23).

Dieses Verfahren der Doppelaktivierung brachte in allen Fällen die weitaus besten Ergebnisse. Die Ausbeuten lagen bei maximal 24 % Adenosin nach 1 Std. (Vergleiche Seite 37).

4. Darstellung von 2'-Desoxyadenosin

a) Einfache Aktivierung

1000 mg Adenin (MG 135,11) und 7 g MPE (432,15) wurden durch magnetisches Rühren in 100 ml DMF gelöst. Die Lösung reagierte 1 Std. bei 50° C. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 50 mg Desoxyribose (MG 134,13) in 10 ml DMF gelöst.

Die Hälfte der aktivierten Adenin-Lösung wurde zur Desoxyribose-Lösung gegeben und mit konz. HCl auf pH 1,5 eingestellt. Das Verhältnis Adenin zu Desoxy-D-Ribose betrug 10 : 1. Die Lösung reagierte bei 50° C. Es wurden Proben von jeweils 20 ml nach 1, 3 und 6 Stdn. entnommen.

b) Doppelaktivierung

50 mg Desoxy-D-Ribose wurden in 10 ml DMF gelöst und mit 175 mg MPE versetzt. Diese Lösung reagierte $\frac{1}{2}$ Std. bei 50° C. Diese aktivierte Lösung wurde mit den restlichen 50 ml der unter a) beschriebenen aktivierten Adeninlösung vereint und mit konz. HCl auf pH 1,5 eingestellt. Das Verhältnis Adenin/Desoxyribose betrug 10 : 1. Die Reaktionstemperatur lag ebenfalls bei 50° C. Es wurden wieder Proben von jeweils 20 ml nach 1, 3 und 6 Stdn. entnommen.

Zu beiden Ansätzen wurde MPE verwendet, das aus sublimiertem P_4O_{10} hergestellt worden war. Die Ausbeuten an Desoxyadenosin wurden durch Säulenchromatographie bestimmt.

α) Aufarbeitung

Die entnommenen Proben wurden zur quantitativen Bestimmung der Ausbeuten an Nucleosid jeweils einzeln aufgearbeitet. - Durch Wasserstrahldestillation entfernte man das DMF. Der zähflüssige Rückstand wurde in 20 ml H_2O aufgenommen, die stark saure Lösung sofort mit 2 n-NaOH neutralisiert und über Nacht bei 0° C stehengelassen. Hierbei fiel der größte Teil der nicht umgesetzten Base aus. Die Mutterlauge enthielt neben Resten an Adenin das Desoxyadenosin, unbekannte Substanzen und außerdem Salze.

Die weitere Aufarbeitung der von den Desoxyadenosin-Ansätzen entnommenen Proben erfolgte über Dowex-1-Formiat-Säulen nach dem Verfahren von W. Andersen et al. (30). Dazu wurde die filtrierte Mutterlauge mit konz. NH_3 auf pH 10,5 eingestellt. Die Dowex-1-Formiatsäulen wurden mit 0,01 m-Formiat-Ammoniak-Puffer auf pH 10,5 äquilibriert. Anschließend gab man die nucleosidhaltige Lösung auf die Säule und eluierte zuerst das Adenindesoxyribosid als Anomerengemisch mit 0,01 m-Formiat-Ammoniak-Puffer pH 9,8. Die Isolierung des nicht umgesetzten Adenins erfolgte danach bei pH 8,25 mit 0,01 m-Formiat-Ammoniak-Lösung als Elutionspuffer.

Die ersten Ansätze nach dem Verfahren der Doppelaktivierung wurden in einem Adenin-Desoxyribose-Verhältnis von 5 : 1 durchgeführt, die späteren mit einem Verhältnis von 10 : 1, da sich dies als günstiger erwiesen hatte.

Die säulenchromatographisch und durch Extinktionsmessungen bestimmte Ausbeute an α- und ß-Desoxyadenosin lag bei allen doppelaktivierten Ansätzen über 20 %.

c) Kristallisation

Das synthetisierte Desoxyadenosin wurde mehrmals mit Petroläther gewaschen und dieser wieder abgesaugt. Anschließend kristallisierte man den Niederschlag aus etwa 20 ml Methanol bei Zimmertemperatur um. Die auskristallisierte Substanz wurde erneut mit wenig Methanol behandelt. Dieses wurde dann abgesaugt und das Kristallisat nochmals mit wenig Methanol gewaschen. Das gereinigte Kristallisat stellte das Anomerengemisch dar.

d) Synthese bei 37° C

1000 mg Adenin löste man mit 3,5 g MPE in 100 ml DMF durch magnetisches Rühren und versetzte diese Lösung dann mit 100 mg Desoxy-D-Ribose in 200 ml DMF. Die Reaktionslösung stellte man mit konz. HCl auf pH 1,5 ein. Das Verhältnis Adenin/Desoxyribose betrug 10 : 1. Die Lösung wurde bei 37° C im Glycerinbad erwärmt. Nach 6, 12, 24, 27 und 30 Stdn. wurden jeweils 60 ml als Proben entnommen.

Die Aufarbeitung erfolgte wie unter α) beschrieben.

Nach 27 Stdn. erreichte man eine maximale Ausbeute von 44,5 % rohem α- und ß-Desoxyadenosin.

5. Darstellung von Adeninglucosid

500 mg Adenin und 3,5 g MPE wurden durch magnetisches Rühren in 50 ml DMF gelöst und mit wasserfreiem Triäthylamin auf einen pH von 7 eingestellt. Anschließend reagierte die Lösung 1 Std. bei 50° C. 100 mg D-Glucose wurden in einem zweiten Reaktionsgefäß in 25 ml DMF gelöst und mit 400 mg MPE versetzt. Der pH-Wert in DMF wurde mit Triäthylamin auf 7 eingestellt. Die Lösung reagierte ebenfalls 1 Std. bei 50° C.

Die beiden aktivierten Lösungen wurden zusammengegeben und mit konz. HCl auf pH 1,5 eingestellt. Die Mischung ließ man bei 50° C reagieren. Nach 1, 3 und 6 Stdn. wurden ihr Proben von jeweils 25 ml entnommen.

Die quantitative Aufarbeitung der einzelnen Proben erfolgte wieder säulenchromatographisch wie bereits beim Adenosin beschrieben wurde. - Die maximale Ausbeute betrug 12 % Nucleosid nach 3 Stdn.

Ansätze, bei denen nur das Adenin aktiviert wurde, ergaben Ausbeuten von nur 7 - 8 %.

6. Darstellung von Adeninfructosid

a) Zutropfen der Fructose

1000 mg Adenin wurden in 100 ml DMF durch 0,5 ml konz. HCl gelöst und mit 5 g MPE versetzt. In einem zweiten Reaktionsgefäß löste man 250 mg D-Fructose in 50 ml DMF. Dann tropfte man diese Fructoselösung langsam unter magnetischem Rühren in einem Zeitraum von 4 - 5 Stdn. in die Adeninlösung von 50° C. Das Verhältnis Adenin/Fructose betrug also 4 : 1. Die präparative Aufarbeitung des Ansatzes erfolgte nach 24 Stdn. Die Ausbeute lag bei 11 %.

Die Auftrennung des Substanzgemisches erfolgte säulenchromatographisch, wie dies bereits beim Adenosin beschrieben wurde.

b) Doppelaktivierung bei 50° C

500 mg Adenin und 3,5 g MPE wurden in 50 ml DMF durch magnetisches Rühren gelöst. Die Lösung ließ man 1 Std. bei 50° C reagieren. 100 mg Fructose wurden in 25 ml DMF gelöst und mit 400 mg MPE versetzt. Dieses Gemisch reagierte ebenfalls 1 Std. bei 50° C.

Beide aktivierten Lösungen wurden zusammengegeben und mit konz. HCl auf pH 1,5 eingestellt. Das Verhältnis Adenin/Fructose betrug 5 : 1. Diese Lösung ließ man weiter bei 50° C reagieren. Es wurden Proben von jeweils 25 ml nach 1, 3 und 6 Stdn. entnommen. Die beste Ausbeute von 17 % Adeninfructosid wurde nach 1 Stdn. erreicht.

c) Doppelaktivierung bei 60° C

Das Verfahren der Doppelaktivierung wurde wie zuvor unter b) beschrieben durchgeführt. Durch Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 60° C ließ sich die Ausbeute auf 20 % steigern.

d) IR-Spektroskopie

Das synthetisierte Adeninfructosid trocknete man zunächst über P_2O_5 im Vakuumexsikkator. Dann wurde es mit KBr als festem Lösungsmittel gut verrieben und gepreßt. Im Leitz-Spektrographen nahm man von dem so behandelten Adeninfructosid das Infrarot-Spektrum auf.

7. Darstellung von 2'-Desoxy-2'-amino-glucosyladenin

500 mg Adenin und 3,5 g MPE wurden in 50 ml DMF unter Rühren gelöst. Dann fügte man bis zum pH 7 wasserfreies Triäthylamin hinzu. Anschließend reagierte die Lösung 1 Std. bei 50° C. 100 mg D-Glucosamin-HCl wurden in einem zweiten Reaktionsgefäß in 25 ml DMF gelöst, 400 mg MPE zugefügt und der pH-Wert in der DMF-Lösung mit Triäthylamin auf 7 eingestellt. Diese Mischung ließ man ebenfalls 1 Std. bei 50° C reagieren. Beide Lösungen wurden vereint und mit einigen Tropfen konz. HCl auf pH 1,5 eingestellt. Nach einer Reaktionsdauer von 3 Stdn. bei 50° C wurde der Ansatz aufgearbeitet, indem man zunächst durch Wasserstrahldestillation das DMF entfernte, dann den Rückstand in H_2O aufnahm und mit NaOH neutralisierte. Weitere Ansätze, bei denen anstelle des DMF Dimethylsulfoxyd als Lösungsmittel verwendet wurde, brachten keine befriedigenden Ergebnisse.

8. Darstellung von 8-Azaguanosin

a) Standardverfahren

1000 mg Azaguanin (MG 152,14) wurden mit 0,5 ml konz. HCl in 100 ml DMF gelöst und mit 3 g MPE versetzt. In einem zweiten Gefäß löste man 200 mg D-Ribose in 50 ml DMF.

Die beiden Lösungen mit dem Verhältnis Azaguanin/Ribose 5 : 1 wurden zusammengegeben, die Reaktionstemperatur lag bei 52° C. Nach 3 Stdn. erfolgte die Aufarbietung des Ansatzes.

b) Zutropfen der Ribose bei 60° C

Wie bereits beim Adenosin beschrieben, wurde die Ribose langsam zugetropft. Die Reaktionstemperatur betrug 60° C. Nach 16 Stdn. wurde die Reaktion beendet und der Ansatz aufgearbeitet.

c) Doppelaktivierung bei 50° C

Einige Ansätze wurden nach dem Verfahren der Doppelaktivierung bei 50° C durchgeführt. Das Verhältnis Azaguanin/Ribose betrug 5 : 1. Nach diesem Verfahren konnte nach 1 Std. eine befriedigende Ausbeute von 15 % 8-Azaguanosin erzielt werden.

9. Darstellung eines Evipan-Ribosids

500 mg Evipan (Methyl-cyclohexenyl-N-methyl-barbitursäure, MG 236,276) löste man mit 1 g MPE in 50 ml DMF. Dann brachte man diese Lösung mit wasserfreiem Triäthylamin auf pH 7. Die Lösung hielt man 1 Std. bei 50° C. 100 mg Ribose und 350 mg

MPE wurden in einem zweiten Reaktionsgefäß in 25 ml DMF gelöst, ebenfalls mit Triäthylamin auf pH 7 gebracht und 1 Std. bei 50° C aktiviert.

Die im ersten Reaktionsgefäß hergestellte Lösung des aktivierten Evipans wurde zugefügt und der pH-Wert mit konz. HCl auf 1,5 eingestellt. Das Verhältnis Evipan/Ribose betrug 5 : 1. Nach 4 Stdn. wurde der Ansatz aufgearbeitet, indem man zunächst das DMF an der Wasserstrahlpumpe abdestillierte. Den Rückstand nahm man in 5 ml H_2O auf. Hierbei fiel das nicht umgesetzte Evipan vollständig aus, da es in H_2O nahezu unlöslich war. Die Ausbeute an Evipan-Ribosid betrug 25 %.

10. Darstellung von Uridin

1000 mg Uracil (MG 112,09) und 3,9 g MPE wurden in 100 ml DMF durch magnetisches Rühren gelöst. Durch Triäthylamin-Zugabe stellte man auf pH 7 ein. Die Lösung ließ man 3 Stdn. bei 50° C reagieren. Die 2. Lösung enthielt 200 mg D-Ribose und 350 mg MPE in 50 ml DMF. Sie wurde mit Triäthylamin auf pH 7 eingestellt. Diese Lösung ließ man eine halbe Stunde reagieren.

Die beiden aktivierten Lösungen wurden zusammengegeben und mit konz. HCl auf pH 1,5 eingestellt. Das Verhältnis Uracil/Ribose betrug 5 : 1. Nach einer Reaktionszeit von 3 Stdn. bei 50° C wurde der Ansatz aufgearbeitet. Die Ausbeute betrug 5 - 8 % an rohem Uridin.

11. Aktivierung von 5-Bromuracil

100 mg 5-Bromuracil (MG 190,998) und 220 mg MPE wurden durch magnetisches Rühren in 10 ml DMF gelöst und mit Triäthylamin auf pH 7 gebracht. Diese Lösung reagierte 3 Stdn. bei 50° C.

Das aktivierte 5-Bromuracil erwies sich papierchromatographisch in verschiedenen Systemen mit dem handelsüblichen 5-Bromuracil identisch.

12. Versuche mit Trifluorothymin

200 mg Trifluorothymin (MG 180,036) und 400 mg MPE wurden durch magnetisches Rühren in 50 ml DMF gelöst und mit Triäthylamin auf pH 7 eingestellt. Diese Lösung ließ man 3 Stdn. bei 50° C reagieren. 20 mg Desoxyribose löste man in 10 ml DMF, fügte 35 mg MPE hinzu und stelle auf pH 7 ein. Diese Lösung ließ man nur eine halbe Stunde reagieren.

Die beiden aktivierten Lösungen wurden zusammengegeben und mit konz. HCl auf pH 1,5 eingestellt. Das Verhältnis F_3T/ Desoxyribose betrug 10 : 1. Nach 4stündiger Reaktionszeit bei 50° C wurde der Ansatz aufgearbeitet.

Die Lösung des mit MPE aktivierten F_3T erwies sich papierchromatographisch mit dem Vergleichs-F_3T identisch.

Wie der chromatographische Vergleich mit Test-Desoxyribosid (36) zeigte, gelang es nicht, das Nucleosid zu synthetisieren.

IV. Zusammenfassung

Grundsätzlich gelang es, ein Verfahren zur Nucleosid-Darstellung zu entwickeln, das wesentlich einfacher als die bisher gebräuchlichen Methoden ist und bei dem weder die Zuckerkomponente noch die Base Schutzgruppen erfordern. In einem Reaktionsschritt konnten mit Hilfe des cyclischen Metaphosphorsäureäthyl-Esters in salzsaurer Dimethylformamid-Lösung eine Reihe von Nucleosiden hergestellt werden. Bei sämtlichen Kondensationen zu Nucleosiden wurde eine Abhängigkeit der Reaktion von pH-Wert, Temperatur und Zeit beobachtet.

Zunächst wurde die Darstellung des MPE präzisiert und sein Verhalten gegenüber OH- und NH-haltigen Verbindungen untersucht. Davon abhängig wurden die stöchiometrischen Verhältnisse bei den Nucleosidsynthesen gewählt.

Besonders eingehend wurde der Bildungsmechanismus des Adenosins verfolgt. Dabei stellte sich heraus, daß sowohl die Zucker- als auch die Purinkomponente mit dem MPE reagieren und anschließend die beiden aktivierten Komponenten unter Mitwirkung von Protonen zu dem gewünschten N-Glykosid zusammentreten. Unter bestimmten Reaktionsbedingungen kann eine Rückspaltung des Adenosins zu den Ausgangskomponenten erfolgen. Bei der Darstellung waren daher sowohl die molaren Verhältnisse der Reaktionspartner als auch die Protonenkonzentration genau einzuhalten. Um optimale Ausbeuten zu erhalten, mußten überdies allzu starke Schwankungen der Protonenkonzentration durch Pufferung vermieden und das richtige Verhältnis der Reaktionszeiten zur Reaktionstemperatur eingehalten werden. Auf diese Weise erhielt man

durch säulenchromatographische Aufarbeitung und anschliessende Reinigung kristallines Adenosin in der ß-Konfiguration mit maximalen Ausbeuten von 28 %.

Theoretisch interessant war besonders die nicht stereospezifisch verlaufende Kondensation des Desoxyadenosins. Bei der Synthese von Desoxyribose mit Adenin wurde ein Anomerengemisch erhalten, in dem die α-Komponente stets überwog. Wegen der Empfindlichkeit der Desoxyribose war es empfehlenswert, die Synthese bei 37° C anstatt bei 50° C durchzuführen. Unter Beachtung dieser Vorsichtsmaßnahmen und der oben angeführten Erkenntnisse ließen sich die Ausbeuten an α- und ß-Desoxyadenosin auf 44 % steigern. Die Konfiguration der Syntheseprodukte entsprach der von N-9-(1'-α-2'-desoxy-ribosyl)-adenin und N-9-(1'-ß-2'-desoxy-ribosyl)-adenin. Unter geringerem Zeitaufwand als bei den klassischen Synthesen mit geschützten Zuckern wurden also höhere Ausbeuten erzielt.

Mit MPE konnten auch die analogen, bisher nicht beschriebenen Verbindungen Adenin-glucosid, Adenin-fructosid und Adenin-aminoglucosid hergestellt werden.

Die Reaktion der Ribose mit 8-Azaguanin ergab ein 8-Azaguanosin, die Synthese von Ribose und Evipan ein Evipan-Ribosid. - Es wurde gezeigt, daß auch die Synthese künstlicher Nucleoside mit dem cyclischen Ester möglich ist. Genauere Konstitutionsermittlungen und kinetische Untersuchungen müssen sich hier noch anschließen.

Wegen der Reaktionsträgheit der Pyrimidine gestaltete sich die Synthese der Pyrimidin-Nucleoside wesentlich schwieriger. Bei der Reaktion von Ribose mit Uracil in Gegenwart

von MPE konnte Uridin erhalten werden. Die Ausbeuten waren jedoch geringer als bei den Purin-Nucleosiden.

Durch die Untersuchungen der Nucleosidsynthese am Beispiel des Adenosins und die Erweiterung des Verfahrens auf andere Nucleoside wurde die Ausgangsbasis für weitere chemische Synthesen künstlicher N-Glykoside geschaffen, die als Antimetaboliten pharmakologische Bedeutung erlangen könnten.

V. Literaturverzeichnis

1. E. Schulze und E. Bosshard
   Z.physiol.Chem. 9, 420
   10, 80 (1885)

2. P.A. Levene und W.A. Jacobs
   Ber. 42, 2703 (1909)

3. K. Boettge, K.H. Jaeger und H. Mittenzwei
   Arzneimittelforschung 7, 24 (1957)

4. A.M. Michelson
   The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides 39 (1963)
   Acad.Press London and New York

5. E.R. Garett
   J.Amer.chem.Soc. 82, 827 (1960)

6. B.R. Baker, J.P. Joseph und R.E. Schaub
   J.Amer.chem.Soc. 77, 5905 (1955)

7. R. Thiel und A. Wacker
   Angew.Chemie 5, 253 (1963)

8. K.O. Smith
   J.Immunology 9, 582 (1963)

9. K.B. Esterbrook und C.I. Davern
   Virology 19, 509 (1963)

10. F. Sorm
    Angew.Chemie 74, 883 (1962)
    Org.: Experientia Basel 18, 213 (1962)

11. D.H. Levin
    J.Biol.Chem. 238, 1098 (1963)

12. G.A. Howard, B. Lythgoe und A.R. Todd
    J.chem.Soc. (London) 1052 (1947)

13. G.E. Hilbert und T.B. Johnson
    J.Amer.chem.Soc. 52, 2001 (1930)

14. J. Davoll und B.A. Lowy
    J.Amer.chem.Soc. 73, 1650 (1951)

15. H. Venner
Chem.Ber. 93, 140 (1960)

16. R.K. Ness, D.L. MacDonald und H.G. Fletcher, Jr.
J.Amer.chem.Soc. 82, 3434 (1960)

17. D.M. Brown, D.B. Parihar, C.B. Reese und Sir A. Todd
Proc.chem.Soc. (London) 321 (1957)

18. A.M. Michelson
The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides 15 (1963)
Acad.Press London and New York

19. G. Schramm, H. Grötsch und W. Pollmann
Angew.Chemie 74, 2, 53-59 (1962)

20. ebenda W. Pollmann
S. 56

21. ebenda W. Pollmann
S. 55

22. G. Schramm und H. Wissmann
Chem.Ber. 91, 1073 (1958)

23. K.Langheld
Chem.Ber. 43, 1857 (1910)

24. W. Pollmann und G. Schramm
B.B.A. 80, 1 (1964)

25. R. Rätz und E. Thilo
Ann.Chem. 572, 173 (1951)

26. F. Cramer und H. Hettler
Chem.Ber. 91, 1181 (1958)

27. W.E. Cohn
J.Amer.chem.Soc. 72, 1471 (1950)

28. E. Chargaff und J.N. Davidson
The Nucleic Acids Vol I, S. 220 (1955)
Acad.Press New York

29. E.L. Jackson
Organic Reactions Vol. 2 (1944)
New York

30. H.D. Schlumberger
unveröffentlicht

31. W. Andersen, C.A. Dekker und A.R. Todd
J.chem.Soc. (London) 2721 (1952)

32. J.A. Carbon
Chemistry and Industry March 30 (1963)

33. J. Kuszmann und L. Vargha
Chem.Ber. 96, 2327 (1963)

34. T.L.V. Ulbricht
Angew.Chemie 74, 769 (1962)

35. F. Micheel
Chemie der Zucker und Polysaccharide 80 (1956)

36. ebenda 164 (1956)

37. W. Hückel
Pharmazeutische Chemie und Arzneimittelsynthese
Band II, 248 (1954)

38. C. Heidelberger, D. Parsons und D.C. Remy
J.Amer.chem.Soc. 84, 3597 (1962)
sowie: C. Heidelberger, persönliche Mitteilung

39. R.B. Hurlebert, H. Schmitz, H.F. Brumm und V.R. Potter
J.biol.Chemistry 209, 23 (1953)

40. H.G. Fritz und B. Röttger
Z.Naturforsch. 18b, 124 (1963)

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

In Freiburg:

Pharmazie:	K.W. Merz
Chemie:	G. Brauer, J. Jander, A. Lüttringhaus
Botanik:	Oehlkers
Physik:	W. Gentner, Th. Schmidt
Pharmakologie:	Enders
Hygiene:	Hummel

In Tübingen:

Pharmazie:	H. Auterhoff, W. Hückel, H. Kaiser
Physiologische Chemie:	G. Schramm, G. Weitzel
Botanik:	E. Bünning, A. Grahle, H. Metzner, W. Nultsch, W. Zimmermann
Pharmakologie:	Kiese, F. Lembeck, Siess
Zoophysiologie:	F. Moehres
Organische Chemie:	E. Müller
Physik:	G. Möllenstedt
Pharmazeutische Gesetzeskunde:	W. Cyran, R. Schmiedel
Pharmakognosie:	K. Hummel
Hygiene und Medizinische Mikrobiologie:	R. Bader

Lebenslauf

Am 27. Februar 1934 wurde ich als Sohn des Forstmeisters Helmut Lünzmann und seiner Ehefrau Gerda, geb. Paravicini in Karlsruhe geboren.

In Bruchsal besuchte ich vier Jahre die Volksschule und anschließend das Real-Gymnasium in Bruchsal, Wiesloch und seit 1948 in Bretten. Nachdem ich eine Oberschulklasse übersprungen hatte, legte ich Ostern 1953 in Bretten das Abitur ab.

Im Mai 1953 begann ich mit der zweijährigen Ausbildung als Apothekerpraktikant, die mit dem im März 1955 in Karlsruhe abgelegten pharmazeutischen Vorexamen abgeschlossen wurde. - Im Sommersemester 1955 begann ich mein Hochschulstudium an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg i.Br. in der Fachrichtung Pharmazie. Wegen eines Unfalls mußte ich mein Studium unterbrechen und setzte es im Wintersemester 1956/57 an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen fort. Im Sommersemester 1959 bestand ich hier das pharmazeutische Staatsexamen. Nach einjähriger Kandidatenzeit erhielt ich im Dezember 1960 die Bestallung als Apotheker.

1961 kehrte ich nach Tübingen zurück und arbeitete bei Herrn Professor Dr. G. Schramm am Max-Planck-Institut für Virusforschung an meiner Doktorarbeit.